

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos tempranos de resistencia de la caña de azúcar
a la infección por *Sporisorium scitamineum* comprometen
la organización del citoesqueleto de las células fúngicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elena Sánchez Elordi

DIRECTORA

María Estrella Legaz González

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

Mecanismos tempranos de resistencia de la caña de azúcar a la
infección por *Sporisorium scitamineum* comprometen la
organización del citoesqueleto de las células fúngicas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADO POR

Elena Sánchez Elordi

DIRECTORA

Dra. Dña. María Estrella Legaz González

MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



Mecanismos tempranos de resistencia de la caña de azúcar a la
infección por *Sporisorium scitamineum* comprometen la
organización del citoesqueleto de las células fúngicas

ELENA SÁNCHEZ ELORDI

MADRID, 2017

Trabajo realizado en el Grupo de Investigación validado *Señalización Celular en Simbiosis Vegetales* del Departamento de Biología Vegetal I de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, que se presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, abril 2017

Fdo. : Elena Sánchez Elordi

Conforme, la directora de tesis

Fdo.: Prof. Dra. Estrella Legaz González

Estas páginas son las últimas que escribo y son casi las más emocionantes. A lo largo de estos años he tenido a mi lado a mucha gente a la que tengo que agradecer muchísimas cosas...

Gracias a todo el "Team" por hacer que me haya sentido siempre en casa. A la Prof. Dra. D^a Blanca Fontaniella por sus consejos y sus ánimos. A Mara, a Borja, a Rocío...porque cuando nos vemos es como si no pasara el tiempo. Gracias al Prof. Dr. D. Roberto de Armas por sus enseñanzas, sus consejos y su tiempo y al Prof. Dr. D. Miguel Vicente por su infinita ayuda. A los "minis"(que ya no lo son): Roberto, Laura, Clara, por tantos momentos divertidos y tantos experimentos juntos. A Clara por su espontaneidad, a Roberto por su cariño y a Laura por cada uno de sus detalles. Gracias a mi G-50 por ayudarme en todo hasta el último día. Gracias por tu comprensión y por tu alegría. Has sido mi mayor apoyo en estos años y ¡no sabes cuánto te he echado de menos en esta última etapa!

Querría agradecer muy especialmente al Prof. Dr. D. František Baluška y a todo su grupo de investigación el brindarme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en Bonn, donde aprendí muchísimo y de donde me llevo un maravilloso recuerdo.

GRACIAS (así, con mayúsculas) al Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba y a la Prof. Dra. D^a María Estrella Legaz González, por cautivarme como solo pueden hacer los buenos maestros. A Estrella, por mantenernos juntos, por sostener al grupo y por luchar por todos, incansable. Siempre me acordaré de ti para no flaquear y "seguir en la lucha". Gracias Carlos por confiar en mí, por dar valor a mis ideas, por la infinita humildad (que sólo tienen los más grandes) y por tu ejemplo. Gracias por tu disponibilidad 24 h. Todavía me acuerdo de todo el tiempo que estuve plantada en la puerta de tu despacho sin atreverme a entrar (hace más de 7 años). ¡Menos mal que lo hice! Hoy te admiro aún más que entonces. Gracias a los dos por cuidarme y hacer que ame lo que hago.

Gracias a mi *chupipandi* y a mis *borregas*, por estar siempre ahí. Gracias a mis amigos biólogos, porque tienen gran culpa de que esta carrera haya sido tan especial. Gracias a Cris, por su fidelidad. Por cada uno de estos años de amistad y por seguir preguntándome cada noche qué tal me ha ido el día. Gracias a Ser, por estar pendiente de mi vida desde la distancia.

Gracias a la música, y a cada una de las personas que me ha dado alguna facilidad para que compagine mis dos pasiones.

Y, sobre todo, gracias a mi familia. A mi hermana, por sus esfuerzos por tenerme siempre entre sus prioridades, por cuidarme como si no pasara el tiempo y por no soltarme nunca de su mano aunque tenga mil personitas más a las que agarrar. Al mejor cuñado del

mundo, porque con su buen humor y su alegría lo facilita todo. A Mario por su dulzura, a Carlitos por su cariño, a Irene por su fortaleza y a Sara por su luz. A los cuatro por darme lecciones cada día, recordándome lo que verdaderamente importa, por cada beso que me habéis dado y por cada vez que habéis corrido a abrazarme. Porque no entendéis de tesis, ni de carreras, ni de títulos y me queréis por lo que soy.

A Paco, por ser mi compañero de vida. Por soportar gran parte del peso que ha supuesto esta tesis y por quererme con mis luces y mis sombras. Gracias por las carcajadas diarias que arreglan mi día y mi vida. Te quiero muchísimo.

En especial y sin dudarlo, gracias a mis padres. Por crear la familia más maravillosa que existe y por enseñarme lo que es el sacrificio, el trabajo, la responsabilidad y el esfuerzo. A los dos, por proporcionarme todo, por ayudar en todo, por luchar por todo. A mi padre por transmitirme su espíritu crítico, su honestidad y su prudencia. Por sentirse orgulloso de mí y hacerme ver que siempre está ahí. A mi madre, por ser mi primera maestra. Por enseñarme a leer, a hacer mi primer trabajo y mi primer índice. Por sentarse conmigo a escribir mi primer cuento. Esta tesis no es más que una prolongación de ese día y de tu esfuerzo. Gracias a los dos. Os quiero.

A mi familia y a Paco

*"Érase una vez
una caña de azúcar y una espora..."*

SUMMARY/RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	19
1-LA ENFERMEDAD DEL CARBÓN	19
1.1-LA PLANTA: <i>Saccharum officinarum</i>	19
1.1.1-Clasificación taxonómica	19
1.1.2-Morfología básica de la planta	19
1.2-EL PATÓGENO: <i>Sporisorium scitamineum</i>	21
1.2.1-Clasificación taxonómica	21
1.2.2-El ciclo vital de los <i>Ustilaginales</i>	21
1.3- EL PATOSISTEMA Y LA ENFERMEDAD	23
2-INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO	26
2.1-GENERALIDADES	26
2.2-LAS POLIAMINAS (PAs) COMO MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	30
2.2.1-Las PAs en el desarrollo de patógenos fúngicos	30
2.2.2-Las PAs como moléculas defensivas en plantas	32
2.3-INTERACCIÓN ENTRE <i>S. officinarum</i> Y <i>S. scitamineum</i>	33
3-MECANISMOS DE DEFENSA DE LA CAÑA DE AZÚCAR ANTE LA INFECCIÓN POR <i>S. scitamineum</i>	34
3.1-UNA DEFENSA MULTIFACTORIAL	34
3.2-LA PRODUCCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DE DEFENSA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR <i>S. scitamineum</i>	36
4-DEFENSA VEGETAL BASADA EN LA PRODUCCIÓN DE LIGNINA Y LIGNANOS	39
4.1-LA SÍNTESIS DE LIGNINA.....	39
4.1.1-Precusores y enzimas involucrados en la síntesis de lignina	39
4.1.2-Formación de lignina	40
4.2-LAS PROTEÍNAS DIRIGENTES EN LA PRODUCCIÓN DE LIGNINA O LIGNANOS	42
4.3-PRODUCCIÓN DE LIGNANOS COMO MECANISMO DE DEFENSA VEGETAL	43

4.4-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE LIGNINAS Y LIGNANOS EN PLANTAS	45
5-EL CITOESQUELETO Y SU FUNCIÓN EN LAS CÉLULAS FÚNGICAS	47
5.1-EL CITOESQUELETO EN LA QUIMIOTAXIS	47
5.1.1-La actina y la miosina en la quimiotaxis	48
5.1.2-Las Rho GTPasas	49
5.1.3-El flujo retrógrado de la actina durante la migración celular	50
5.1.4-Los MT en la quimiotaxis	51
5.2- EL CITOESQUELETO EN LA GERMINACIÓN	51
5.2.1-El complejo actina-miosina en la germinación	52
5.2.2-Los MT en la germinación	53
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1-MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO	61
1.1-SIEMBRA Y MANTENIMIENTO DE LAS PLANTAS EN EL INVERNADERO	61
1.2-AISLAMIENTO DEL PATÓGENO	61
1.2.1-Aislamiento de teliosporas del carbón	62
1.2.2-Obtención de esporidios sexualmente diferenciados a partir de teliosporas	62
2-OBTENCIÓN DE TEJIDO PARA LA EXPERIMENTACIÓN A PARTIR DE PLANTAS DE MY 55-14 Y B 42231 INOCULADAS Y NO INOCULADAS	63
2.1-INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS.....	63
2.1.1-Preparación de esporidios compatibles	63
2.1.2-Procedimiento de inoculación	64
2.2-OBTENCIÓN DE TEJIDO MERISTEMÁTICO Y FOLIAR.....	66
3- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS PARA LOS EXPERIMENTOS	66
3.1-EXTRACCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS HMMG Y MMMG A PARTIR DE TALLOS DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR	66
3.1.1-Procesamiento del jugo previo a su separación.....	66

3.1.2-Obtención de las glicoproteínas por cromatografía de exclusión molecular	66
3.2-OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS FÚNGICAS SEGREGADAS POR LAS TELIOSPORAS DURANTE SU GERMINACIÓN	69
3.3-OBTENCIÓN DE FP CONTENIENDO ARGINASA INACTIVADA	69
3.4-SEMI-PURIFICACIÓN DE ARGINASAS CONTENIDAS EN LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG O EN LAS FP	70
3.4.1-Obtención de ureasa a partir del líquen <i>E. prunastri</i>	70
3.4.2-Preparación de columnas de agarosa activada	71
3.4.3- Obtención de fracciones de arginasa semi-purificada	71
3.5-OBTENCIÓN DE TUBULINA SEMI-PURIFICADA A PARTIR DEL LISADO CELULAR DE <i>S. scitamineum</i>	72
4-EXTRACCIÓN DE LIGNANOS TOTALES A PARTIR DE TEJIDO DE CAÑA DE AZÚCAR	73
5-SEPARACIÓN DE LIGNANOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL	75
5.1- PREPARACIÓN DE PATRONES DE LIGNANOS PARA SU SEPARACIÓN POR CZE.	75
5.2- PREPARACIÓN DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS DE LIGNANOS PARA SU SEPARACIÓN POR CZE....	75
5.3-CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN DE LIGNANOS POR CZE.....	76
6-EXTRACCIÓN DE PA _s PRODUCIDAS POR LAS TELIOSPORAS DE <i>S. scitamineum</i>	77
7-SEPARACIÓN DE PA _s POR ELECTROFORESIS CAPILAR	79
7.1-PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE PA _s PARA SU SEPARACIÓN POR CE..	79
7.2- PREPARACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE PA _s PARA SU SEPARACIÓN POR CE	80
7.3-CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN DE PA _s POR CE.....	80
8-VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	81
8.1-VALORACIÓN DE ACTIVIDAD UREASA.....	81
8.2- VALORACIÓN DE ACTIVIDAD ARGINASA.....	83
8.3-VALORACIÓN DE ACTIVIDAD GLUCANASA Y QUITINASA.....	85
8.3.1-Valoración en las HMMG antes y después del contacto con las teliosporas.	85
8.3.2-Valoración en las teliosporas antes y después del contacto con las HMMG	87
9-VALORACIÓN DE PROTEÍNAS	87

10-ENSAYOS DE QUIMIOATRACCIÓN	88
11- ENSAYOS DE CITOAGLUTINACIÓN	91
12-ANÁLISIS POR MICROSCOPIA	93
12.1-MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA.....	93
12.1.1- Ensayos con proteínas marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	93
12.1.1.1-Ligamiento y desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas.....	93
12.1.1.2-Ligamiento de HMMG-FITC a la pared de las teliosporas.....	94
12.1.1.3-Ligamiento y desorción de AFA, IFA y SCA a la pared de las teliosporas	95
12.1.1.4- Diferencias en el patrón de unión de AFA e IFA a la pared celular	95
12.1.1.5- Polarización de la actina en presencia de nocodazol (Noc).....	97
12.1.2-Marcaje nuclear con DAPI	97
12.1.2.1- Alteraciones nucleares en teliosporas incubadas en PUT y SPD	97
12.1.2.2- Alteraciones nucleares en esporidios aislados (+) tratados con lignanos comerciales	98
12.2-MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO	98
12.3-MICROSCOPIO INVERTIDO	98
12.4-MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL	99
12.4.1-Localización de actina y miosina en las teliosporas de <i>S. scitamineum</i> en ausencia y en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14	99
12.4.2-Localización actínica y nuclear en las teliosporas de <i>S. scitamineum</i> durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.....	100
12.4.3- Marcaje nuclear <i>in vivo</i> de células tratadas con HMMG	102
12.4.4- Localización microtubular y nuclear en las teliosporas de <i>S. scitamineum</i> durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.....	102
12.5-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	104
12.5.1- Análisis por microscopía electrónica de transmisión,TEM (<i>Transmission Electron Microscopy</i>).....	104
12.5.2- Análisis por microscopía electrónica de barrido, SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>).	105
12.5.3- Localización de la actina por TEM mediante anticuerpos unidos a ferritina	106

13-ENSAYOS DE GERMINACIÓN	106
13.1-ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN AGAR O,1% (P/V)	106
13.2-ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN TUBOS EPPENDORF Y VISUALIZACIÓN EN CÁMARAS DE NEUBAUER	109
13.2.1-Germinación de teliosporas en presencia de PAs	109
13.2.2-Germinación de teliosporas y desarrollo de esporidios en presencia de lignanos comerciales	109
14-SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS (PAGE-SDS).....	110
14.1- PAGE-SDS Y POSTERIOR TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA	110
14.2-PAGE-SDS Y POSTERIOR TRANSFERENCIA A MEMBRANA (WESTERN BLOTTING) PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR ANTICUERPOS ESPECÍFICOS	113
14.2.1- Detección de actina y miosina en las teliosporas de <i>S. scitamineum</i>	113
14.2.2- Detección de tubulina en las teliosporas de <i>S. scitamineum</i>	114
14.3-PAGE-SDS Y ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS FRACCIONES HMMG Y MMMG	115
15-CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES PARA CAD Y PROTEÍNAS DIR	116
15.1-AISLAMIENTO DEL ARN	116
15.2-TRANSCRIPCIÓN INVERSA.	117
15.3-PCR SEMICUANTITATIVA	117
15.4-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA O q RT-PCR.	117
16-EXPERIMENTOS DE POLIMERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MICROTÚBULOS (MT).....	118
16.1-POLIMERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MT EN PRESENCIA DE NOCODAZOL (Noc)	118
16.2-POLIMERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MT EN PRESENCIA DE PAs.	119
17-ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO Y LA CONJUGACIÓN DE COLONIAS DE ESPORIDIOS DE <i>S. scitamineum</i>	119
18-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	122

RESULTADOS	125
1-EFECTOS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LAS TELIOSPORAS DE <i>S. scitamineum</i>	125
1.1-QUIMIOTRACCIÓN Y CITOAGLUTINACIÓN DE LAS TELIOSPORAS	125
1.2- EFECTOS DERIVADOS DE LA QUIMIOTAXIS	127
1.2.1-Disminución del tamaño de las aglutinaciones tras el pico de quimiotaxis.	128
1.2.2-Liberación de las glicoproteínas retenidas sobre la pared celular a las 6 h.....	129
1.2.3-Actividad degradativa en las HMMG relacionada con la pérdida del efecto quimiotáctico y aglutinante	131
1.3-IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOATRACTANTE Y CITOAGLUTINANTE EN LAS GLICOPROTEÍNAS.....	131
1.3.1-Obtención de arginasa de caña semi-purificada a partir de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14.....	132
1.3.2-La SCA y las enzimas degradativas como agentes quimioattractantes	133
1.3.3-La arginasa y las enzimas degradativas como agentes citoaglutinantes.....	133
1.4-COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG ENTRE AMBOS CVS.	135
1.4.1-Efecto de las HMMG de ambos cvs. sobre la germinación de las teliosporas	135
1.4.2-Comparación del contenido y la actividad de SCA entre cvs.	137
1.4.3-Efecto de las HMMG y las SCAs de ambos cvs. sobre la citoaglutinación	139
1.4.4-Efecto de las HMMG sobre el crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -).....	141
2-IDENTIFICACIÓN DEL CARÁCTER LECTÍNICO DE LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG	142
12.1-EXISTENCIA DE LIGANDOS DE PARED EN LAS TELIOSPORAS PARA EL RECONOCIMIENTO DE LECTINAS VEGETALES	143
2.2-COMPETENCIA ENTRE LA CON A Y LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG POR SU LUGAR DE UNIÓN A LA PARED FÚNGICA	145
3-EXISTENCIA DE UNA SEÑAL DE <i>QUORUM SENSING</i> PREVIA A LA INFECCIÓN EN LA POBLACIÓN FÚNGICA	146
3.1-SIMILITUDES ENTRE EL CONTENIDO DE LAS FP Y LAS HMMG	147
3.1.1-Existencia de arginasa en las FP	147
3.1.2-Actividad quimioattractante en las FP.....	149

3.1.3-Actividad degradativa en las FP.....	149
3.1.4-Capacidad aglutinante de las FP	150
3.2-LAS FP Y LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG: SEÑAL DE QUÓRUM O DE FALSO QUÓRUM ...	151
4-COMPETENCIA ENTRE LA SCA Y LA ARGINASA FÚNGICA	154
4.1-AFINIDAD DE LAS DISTINTAS ARGINASAS POR SU LIGANDO DE PARED EN LAS TELIOSPORAS: EXPERIMENTOS DE UNIÓN Y DESORCIÓN	155
4.2-NIVEL DE ACTIVIDAD ARGINASA QUE ESTIMULA LA GERMINACIÓN	157
5-LA ACTINA Y LA MIOSINA EN LAS TELIOSPORAS DE <i>S. scitamineum</i>	159
5.1-SOSPECHA DE SU IMPLICACIÓN EN LA MOTILIDAD DE LAS TELIOSPORAS	159
5.1.1-Ausencia de estructuras externas implicadas en la motilidad.....	159
5.1.2-Experimentos de quimioatracción en presencia de inhibidores de la funcionalidad de la actina y la miosina.	161
5.2-IMPLICACIÓN DE LA ACTINA Y LA MIOSINA EN LA GERMINACIÓN DE LAS TELIOSPORAS	163
5.3-CONFIRMACIÓN DE LA EXISTENCIA DE ACTINA Y MIOSINA EN LAS TELIOSPORAS	165
5.3.1-Detección por <i>Western Blotting</i>	165
5.3.2- Detección por microscopía óptica confocal: colocalización actina-miosina.....	167
5.3.3- Detección por microscopía óptica confocal: colocalización actina-núcleo	175
5.3.4 Localización de la actina fúngica mediante microscopía electrónica.	177
5.4-EFECTO DE LAS HMMG DE PLANTAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS SOBRE LA ORGANIZACIÓN ACTÍNICA Y NUCLEAR DE LAS TELIOSPORAS.....	178
6-EFECTO DE LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG SOBRE LA ORGANIZACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS (MT) DE LAS TELIOSPORAS	180
6.1-PRESENCIA DE TUBULINA EN LAS CÉLULAS FÚNGICAS.....	180
6.1.1-Extracción de tubulina fúngica y detección por electroforesis	180
6.1.2-Interacción de la tubulina fúngica aislada con Nocodazol (Noc).....	181
6.1.3-Efecto del taxol sobre el inmunomarcaje de los MT en el interior celular	182
6.2-FUNCIÓN DE LOS MT EN LAS TELIOSPORAS DE <i>S. scitamineum</i>	183
6.2.1-Implicación de los MT en la germinación	183

6.2.2-Implicación de los MT en la quimioatracción	184
6.2.3-Implicación de los MT en el proceso de aglutinación	185
6.2.4-Implicación de los MT en la polimerización de la actina	186
6.3-EFECTO DE LAS HMMG PROCEDENTES DE PLANTAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS SOBRE LA ORGANIZACIÓN MICROTUBULAR Y NUCLEAR DE LAS TELIOSPORAS.....	187
6.3.1-Efectos de las glicoproteínas HMMG sobre la migración nuclear: marcaje in vivo	187
6.3.2-Efectos de las glicoproteínas HMMG sobre la polimerización de los MT.....	188
6.3.3- Efecto de las glicoproteínas HMMG sobre la condensación nuclear	190
7-ALTERACIONES CELULARES PROVOCADAS POR LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG POR MEDIO DE LA PRODUCCIÓN DE PAs	194
7.1-LAS PAs SOBRE EL DESARROLLO DEL PATÓGENO	194
7.1.1-Efecto de las PAs sobre las germinación de las teliosporas.....	194
7.1.2-Efecto de las PAs sobre la polimerización de la tubulina semi-purificada	196
7.1.3-Efecto de las PAs sobre la condensación nuclear.....	197
7.2-SEPARACIÓN POR CE DE PAs PRODUCIDAS POR TELIOSPORAS DE <i>S. scitamineum</i> EN PRESENCIA O EN AUSENCIA DE HMMG.....	198
8-LOS LIGNANOS COMO METABOLITOS DEFENSIVOS PRODUCIDOS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN	202
8.1-NIVELES DE PROTEÍNA DIRIGENTE (DIR) Y DE LA ENZIMA CINAMIL ALCOHOL DESHIDROGENASA (CAD) EN CAÑA	203
8.1.1-Identificación de proteínas DIR en las glicoproteínas de caña de azúcar	203
8.1.2-Variación en los niveles de expresión de los genes <i>SofDIR16</i> y <i>SofCAD</i> en caña de azúcar tras su inoculación	206
8.2-IDENTIFICACIÓN DE LIGNANOS EN EL TEJIDO MERISTEMÁTICO Y FOLIAR DE CAÑA DE AZÚCAR POR CZE.....	209
8.3- EFECTO DE LOS LIGNANOS SOBRE EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DEL PATÓGENO	214
8.3.1-Germinación de teliosporas y desarrollo del micelio en presencia de pinoresinol y <i>secoisolariciresinol</i> comerciales.....	214
8.3.2-Desarrollo de colonias de <i>S. scitamineum</i> en presencia de pinoresinol y <i>secoisolariciresinol</i> comerciales.....	219
8.3.3-Medida de la cantidad de proteínas contenidas en las colonias durante su crecimiento en presencia de pinoresinol y <i>secoisolariciresinol</i>	224

8.3.4-Desarrollo de la colonia en presencia de la mezcla de lignanos comerciales.....	225
8.3.5-Alteración de la organización nuclear en presencia de la mezcla de lignanos comerciales.....	227
8.4-EFECTOS DE LOS EXTRACTOS DE LIGNANOS DE TEJIDO MERISTEMÁTICO DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE EL DESARROLLO DEL PATÓGENO.....	228
8.4.1-Desarrollo de las colonias en presencia de un extracto de lignanos de tejido meristemático de caña de azúcar	228
8.4.2-Variación en el contenido proteico de las colonias en presencia de los extractos de lignanos	229
8.4.3-Desarrollo de las colonias en presencia de extractos de lignanos de caña de azúcar	231
8.4.4- Germinación de teliosporas en presencia de extracto de caña	231
DISCUSIÓN.....	237
1-LA CITOAGLUTINACIÓN, EL INICIO DE LA RESISTENCIA.....	237
2-¿POR QUÉ QUIMIOTROPISMO Y CITOAGLUTINACIÓN COMO MECANISMO DE RESISTENCIA? SIMULACIÓN DE LA SEÑAL DE <i>QUORUM SENSING</i>	248
3-LA ARGINASA... ¿DE QUIÉN?	252
4-LAS GLICOPROTEÍNAS ORGANIZAN EL CITOESQUELETO DE LAS TELIOSPORAS PARA ESTIMULAR SU MOTILIDAD Y LO DESORGANIZAN PARA EVITAR SU GERMINACIÓN.....	254
4.1-IMPPLICACIÓN DE LA ACTINA Y LA MIOSINA EN LA QUIMIOTAXIS.....	255
4.2-IMPPLICACIÓN DEL CITOESQUELETO EN LA GERMINACIÓN	260
4.3-EFECTO DE HMMG SOBRE LA ORGANIZACIÓN Y DESORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO	265
5-SCA EJERCE SU ACCIÓN INHIBITORIA DE LA GERMINACIÓN MEDIANTE LA PRODUCCIÓN NO REGULABLE DE POLIAMINAS (PA _s)	269
6-¿Y SI LAS PROTEÍNAS DEFENSIVAS FALLAN? PRODUCCIÓN TEMPRANA DE LIGNANOS CITOTÓXICOS.....	276
7-VISIÓN GLOBAL DEL PROCESO DE DEFENSA EN LOS PRIMEROS ESTADIOS	285
CONCLUSIONES	291
BIBLIOGRAFÍA.....	295

Figura 1 Grupo de esporas de <i>S. scitamineum</i> visualizado a través de un microscopio óptico. La barra de escala indica 3 µm.	21
Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida del grupo de patógenos <i>Ustilaginales</i>	22
Figura 3. Imagen tomada de Sundar <i>et al.</i> , 2012 donde puede observarse la estructura del "látigo", conteniendo una gran masa de esporas.	24
Figura 4. Representación de la compatibilidad/ incompatibilidad en la interacción planta-patógeno debida a la presencia/ausencia de genes R de reconocimiento específico ante genes de avirulencia de patógenos potenciales..	27
Figura 5. Triángulo que representa los tres elementos que necesariamente deben interaccionar para un establecimiento exitoso de la enfermedad. La planta ha de ser susceptible a la infección, el patógeno compatible y virulento, y las condiciones ambientales las adecuadas para que la infección se desarrolle..	27
Figura 6. Esquema de la formación del <i>quorum sensing</i> durante la interacción planta-patógeno. Las células producen moléculas difusibles que permiten la comunicación célula-célula con otros miembros de la población (1). Esto favorece la agrupación de un gran número de células en el punto de infección y su desarrollo (2). Cuando el nivel de densidad poblacional es el adecuado para una infección exitosa (3), se estimula la expresión de genes específicos de virulencia (4), que permitirán la invasión en la planta (5, 6).....	29
Figura 7. Esquema de la síntesis de PAs en plantas (modificado de Walters, 1995).....	31
Figura 8. Esquema que representa cómo la arginasa contenida en las glicoproteínas podría ser internalizada en las teliosporas, causando el incremento de PUT responsable de la inhibición del establecimiento de la polaridad celular en las células. Representando (●) la arginasa, (□) un transportador para la arginasa y (∪) el ligando de pared para la enzima.	39
Figura 9. Ruta esquematizada de síntesis de los monolignoles que darán lugar a los tres tipos de lignina en plantas. PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-hidroxicinamoil CoA ligasa; CCR, cinamoil CoA reductasa; CAD, cinamil alcohol deshidrogenasa ; SAD, sinapil alcohol deshidrogenasa ; C3H, <i>p</i> -cumarato 3-hidroxilasa; F5H, ferulato 5-hidroxilasa ; OMT, <i>O</i> - metiltransferasa. Modificado de Boudet <i>et al.</i> , 2007.....	41
Figura 10. Representación esquemática de la hipótesis de la producción de lignanos por disminución de las actividad de las proteínas DIR, envueltas en la estereoselectividad del pinoresinol.	43



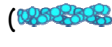


Figura 11. Figura modificada de Moss, 2000. a) Unidad C_6C_3 que dará lugar al lignano, al dimerizarse. b) Formación del enlace 8-8' que da lugar al lignano.	44
Figura 12. Esquema de la síntesis de (-)-lariciresinol, (-)-secoisolariciresinol y (-)-matairesinol a partir del incremento de (-)- pinoresinol derivado de la disminución de la actividad de las proteínas DIR..	46
Figura 13. Esquema general de la activación de las proteínas Rho GTPasas (modificado de Fiorentini <i>et al.</i> , 2002).	49
Figura 14. Modificado de Case y Waterman, 2015. Representando () miosina II, () actina G, () actina F, () el sustrato, () la dirección del flujo retrógrado y (+) el extremo de crecimiento neto del filamento de actina: (a) En estado estacionario existe un equilibrio entre la polimerización y el flujo retrógrado. Éste está mediado por la miosina, que desplaza el filamento de actina hacia atrás y evita el movimiento de avance del lamelipodio. (b) El movimiento hacia delante es derivado de la unión celular al sustrato, lo que frena el flujo retrógrado y permite la extensión del lamelipodio mediante la polimerización del filamento. ...	51
Figura 15. Estructura química de la citocalasina A, agente inhibidor de la dinámica de los filamentos de actina.	53
Figura 16. Estructura química de la Lat A (a) y B (b), agentes despolimerizantes de los filamentos de actina.	53
Figura 17. Imagen de las plantas de caña de azúcar en el interior del invernadero del Real Jardín Botánico de la Universidad Complutense de Madrid.	62
Figura 18. Esquema de los cruzamientos entre las 6 colonias aisladas (A-F) de esporidios de <i>S. scitamineum</i> . N (No), ausencia de micelio; S (Si), presencia de micelio.	63
Figura 19. Esquema de la metodología aplicada para la obtención de jugo de caña (a), tejido meristemático (b) y tejido foliar (c, d, e) a partir de plantas de caña de azúcar no inoculadas (III), inyectadas con agua (II) o inoculadas con una mezcla de esporidios compatibles (+ y -) (I). En cada caso (control/inyección con agua/ inoculación con esporidios) se obtuvieron 6 tallos y 6 hojas con los que se realizaron <i>pools</i> correspondientes al jugo extraído, el tejido meristemático y el tejido foliar para cada sección de hoja. . .	65
Figura 20. Perfil de elución de la disolución de azul dextrano 29 mM y $CoCl_2$ 0,33 M en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 a través de una columna rellena con Sephadex G-10. Ve: volumen de eluato..	67

Figura 21. Perfil de elución de la disolución de azul dextrano 29 mM y CoCl_2 0,33 M en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 a través de una columna rellena con Sephadex G-50. Ve: volumen de eluato.	68
Figura 22. Esquema del proceso de semi-purificación de la arginasa contenida en el total de glicoproteínas HMMG o FP. Br-CN: bromuro de cianógeno. Metodología detallada en el texto, apartado 3.4.	71
Figura 23. Esquema del protocolo seguido para la extracción de lignanos a partir de tejido meristemático de plantas de caña de azúcar. Metodología detallada en el texto, apartado 4..	74
Figura 24. Esquema de la metodología, detallada en el texto, utilizada para la extracción de PAs producidas por las teliosporas de <i>S. scitamineum</i>	78
Figura 25. Figura 25. A la izquierda, composición de las placas control y problema. A la derecha, etapas del método de microdifusión de Conway (1962) utilizado para la valoración de la actividad ureasa. Metodología detallada en el texto, apartado 8.1..	82
Figura 26. A la izquierda, composición de las placas control y problema en el ensayo para la valoración de la actividad arginasa en las fracciones obtenidas a partir de la semi-purificación de la enzima. A la derecha, etapas del método de Legaz y Vicente (1982), modificado a partir del método de microdifusión de Conway (1962), para la valoración de la actividad arginasa. Metodología detallada en el texto, apartado 8.2..	84
Figura 27. Esquema de la metodología llevada a cabo para la recuperación de glicoproteínas HMMG tras su incubación con teliosporas de <i>S. scitamineum</i> durante 3 h. Las actividades β -1,3-glucanasa, β -1, 4-glucanasa y quitinasa fueron valoradas en la fracción HMMG antes y después del contacto con las teliosporas. Metodología detallada en el texto, apartado 8.3.1..	86
Figura 28. Esquema del método utilizado en el ensayo de la quimiotaxis. Se representa el vidrio de reloj, el capilar conteniendo el agente quimioattractante y las esporas al comienzo del experimento, antes de desplazarse. Metodología detallada en el texto, apartado 10.	88
Figura 29. Esquema de la metodología utilizada en los ensayos de citoaglutinación. Metodología detallada en el texto, apartado 11.....	91
Figura 30. Representación esquemática del procesamiento de una imagen obtenida por microscopía óptica para la valoración del nivel de aglutinación. Las agrupaciones se clasificaron según el número de células que contenían, cuantificándose el número de agregados que existían de cada tipo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de teliosporas implicado en la formación de cada tipo de agregado, según es explicado en el texto.....	93

Figura 31. Esquema del protocolo del experimento de desorción de las proteínas SCA, AFA e IFA fluorescentes (en verde) tras su unión a la superficie de las teliospora en presencia de las mismas proteínas sin marcar.....	96
Figura 32. Representación de la red de conteo existente en la cámara de Neubauer. Se indican los cuadrados en los que se valoró el porcentaje de germinación en cada tratamiento, señalados por el paso de las dos diagonales.....	109
Figura 33. Esquema de la metodología aplicada en el ensayo de crecimiento (a) y conjugación (b) de colonias de esporidios de <i>S. scitamineum</i> creciendo en secciones de PDA al 4,2 % (p/v) conteniendo HMMG de ambos cvs. Metodología detallada en el texto, apartado 17.	120
Figura 34. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 (Control), HMMG/MMMG de plantas del cv. My 55-14 o HMMG/MMMG de plantas del cv. B 42231. El experimento tuvo lugar durante 6 h. Las barras verticales indican el Error Estándar (EE) correspondiente a las medias de las valoraciones. .	125
Figura 35. Micrografías en campo claro obtenidas mediante microscopía óptica donde puede observarse la citoaglutinación existente en los capilares tras 5 h de incubación con las distintas glicoproteínas, B 42231HMMG (a), B 42231 MMMG (b), My 55-14 HMMG (c) y My 55-14 MMMM (d), durante los experimentos de quimiotaxis. Las barras de escala indican 20 µm. .	126
Figura 36. Imágenes obtenidas mediante microscopio invertido que muestran la secuencia temporal del desplazamiento de teliosporas hacia un capilar conteniendo 0,41 mg•mL ⁻¹ de HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 tras 25 min (1), 27 min (2), 29 min 30 s (3) y 30 min 30 s (4) de la inmersión el capilar en el pocillo. Se indica la trayectoria de desplazamiento de una espora aislada (*) y de un grupo de dos esporas(*). Los números indican el orden de la secuencia temporal.	126
Figura 37. Imágenes obtenidas mediante microscopio invertido que muestran la secuencia temporal del desplazamiento de un grupo de teliosporas, (*), durante la formación de una gran aglutinación en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14.	127
Figura 38. Evidencias de la variación en el grado de agregación de las teliosporas tras 5 ó 6 h (izquierda y derecha, respectivamente) del contacto con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. La barra de escala indica 100 µm (A). Cuantificación del porcentaje de teliosporas implicadas en la formación de los distintos tipos de agregados (de 1 a 500 células) en función del tiempo de exposición a las glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 (5 ó 6 h) (B).....	128

- Figura 39. Agregación de las teliosporas tras la estimulación quimiotáctica en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 marcadas con FITC. Niveles de fluorescencia en el sobrenadante tras el contacto de las glicoproteínas con las teliosporas a lo largo del tiempo de ensayo hasta la desaparición de los efectos quimiotáctico y citoaglutinante a las 6 h. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones (A). Micrografías en campo claro (I, III y V) y fluorescencia (II, IV y VI) obtenidas por microscopía óptica que muestran imágenes de teliosporas recuperadas a las 5h (I y II) y a las 6 h (III, IV, V y VI) del comienzo del experimento.. Las flechas blancas indican la presencia de células polarizadas. Las flechas rojas señalan teliosporas que han perdido su protoplasto y se muestran como paredes celulares vacías. Las barras de escala indican 20 μm (B).). 130
- Figura 40. Niveles de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa (β -1,3-glu) y β -1,4-glucasa (β -1,4-glu) contenidos en las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 antes (en blanco) y después (en gris) del contacto durante 3 h con teliosporas de *S. scitamineum*. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 131
- Figura 41. Actividad arginasa valorada en las fracciones obtenidas tras el proceso de semi-purificación de la SCA a partir de las HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. 132
- Figura 42. Electroforesis de las HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (1) y de la SCA semi-purificada a partir de las mismas HMMG (2). El marcador (M) indica la migración correspondiente a cada peso molecular, en kDa. Se señala las dos bandas, de 85 y 100 kDa, observadas para la arginasa aislada. 132
- Figura 43. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de My 55-14 (C), β -1,3-glucanasa comercial, β -1,4-glucanasa comercial, quitinasa comercial o SCA. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 133
- Figura 44. Ensayo de citoaglutinación en presencia de agua (control negativo), de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (control positivo), de SCA semi-purificada, de quitinasa comercial y de β -1,4-glucanasa comercial. Se indica, por tratamiento, el porcentaje celular implicado en la formación de los distintos tipos de agregados, que fueron clasificados por el número de teliosporas que contenían (teliosporas no agregadas; grupos de 2 a 50 células; grupos de 51 a 100 células; grupos de 101 a 200 células y grupos formados por más de 200 células). 134

- Figura 45. Micrografías en campo claro obtenidas por microscopía óptica tras el ensayo de citoaglutinación en presencia de agua (A), HMMG de plantas control del cv. My 55-14 (B), SCA semi-purificada a partir de las glicoproteínas HMMG (C), quitinasa (D) o β -1,4-glucanasa (E). Las barras de escala indican en todos los casos 100 μ m.135
- Figura 46. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de glicoproteínas HMMG (0,41 mgmL⁻¹) de plantas inoculadas (I, inoculadas) y no inoculadas (C, control) de los cv. My 55-14 y B 42231. Un control, correspondiente a teliosporas incubadas en ausencia de glicoproteínas fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).136
- Figura 47. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes (0,06-0,25 mg•mL⁻¹) de glicoproteínas HMMG y SCAs de los cvs. My 55-14 y B 42231. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.136
- Figura 48. PAGE-SDS de las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas (1) o inoculadas (2) del cv. My 55-14 así como por plantas no inoculadas inoculadas (3) o inoculadas(4) del cv. B 42231. El marcador, en el centro, indica la migración correspondiente a cada peso molecular, en kDa. Se señalan las bandas correspondientes a las distintas SCAs, de las cuales se realizó una densitometría mediante el programa ImageJ.137
- Figura 49. Resultados de la densitometría de las bandas de SCAs, normalizados para la cantidad de arginasa contenida en la muestra de HMMG de plantas inoculadas del cv. My 55-14, a la que se adjudicó arbitrariamente el valor de 1 (unidades relativas). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Las letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).138
- Figura 50. Actividad arginasa contenida en las glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 4223. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Las letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).138
- Figura 51. Niveles de arginasa activa (rojo oscuro) e inactiva (rojo pálido) contenidos en las glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (Control, C) de los cvs. My 55-14 y B 42231 y estimados a partir de los resultados de cantidad de SCA (ver Figura 49) y actividad arginasa (ver Figura 50) obtenidos tras los distintos tratamientos.139

Figura 52. Ensayo de citoaglutinación en presencia de glicoproteínas HMMG y SCAs pre-purificadas de plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 4223. Un control en ausencia de proteína fue incorporado al experimento. Se indica, por tratamiento, el porcentaje celular implicado en la formación de los distintos tipos de agregados, que fueron clasificados por el número de teliosporas que contenían (teliosporas no agregadas; grupos de 2 a 50 células; grupos de 51 a 100 células; grupos de 101 a 200 células y grupos formados por más de 200 células).140

Figura 53. Crecimiento de colonias de esporidios aislados (+), (A), y compatibles (+ y -), (B), sobre medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo glicoproteínas HMMG producidas por plantas control (C) e inoculadas (I) de los cvs. My 55-14 y B 42231. Una colonia control creció en ausencia de glicoproteínas. Las fotografías fueron tomadas a las 24, 29 y 48 h mediante un microscopio estereoscópico. Las flechas señalan la aparición de micelio dicariótico. Las barras de escala indican 1 mm.142

Figura 54. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de ConA $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Un control, realizado en ausencia de la lectina fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar $0,1\%$ (p/v) tras 15 h de incubación. Se muestra el porcentaje de esporas germinadas (en blanco) y no germinadas (en gris) (A). Número de teliosporas libres (■), agrupadas (●) o esporidios (▲) cuantificados en el medio tras la incubación en presencia de concentraciones crecientes de ConA ($0,06$ - $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. En A las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), en redonda para el porcentaje de células germinadas, en cursiva para el porcentaje de células no germinadas.....143

Figura 55. Micrografías en campo claro obtenidas por microscopía óptica correspondientes a teliosporas de *S. scitamineum* incubadas en ausencia (A y B) o en presencia de ConA $0,06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C), $0,14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D y E) o $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (F, G, H, I). Las flechas blancas indican la abundancia de esporidios liberados por gemación; las flechas negras señalan la presencia de un ensanchamiento apical, que fue observado en muchas hifas en presencia de ConA; las flechas rojas resaltan la visualización de hifas alargadas y ramificadas en presencia de la lectina. Las barras de escala indican $50 \mu\text{m}$ en A, B, C, G, H e I y $10 \mu\text{m}$ en D, E y F.....144

Figura 56. Porcentaje de ConA-FIT retenida en la pared de las teliosporas tras la incubación de las células en presencia de la lectina. En las imágenes de fluorescencia, obtenidas mediante microscopía óptica, las flechas blancas señalan las áreas no fluorescentes en las células (A). Porcentaje de fluorescencia desorbida a partir de las células marcadas con ConA tras el contacto con las glicoproteínas HMMG del cv. resistente (My 55-14) antes (C, control) o después de inocular (I, inoculado) y tras la incubación en presencia de metil manosa. En las

imágenes de fluorescencia, obtenidas mediante microscopía óptica, las flechas rojas señalan aquellas células que han perdido su fluorescencia, probablemente tras la incubación con el agente correspondiente (B).	145
Figura 57. Cantidad de proteínas (A) y actividad arginasa (B) contenidas en las FP producidas por las teliosporas durante tiempos variables de germinación (1,5, 3, 4,5 y 6 h). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.	147
Figura 58. Actividad arginasa de la fracción que contenía mayor actividad tras el proceso de semi-purificación de la enzima a partir de las FP producidas por las teliosporas durante tiempos variables de germinación (1,5, 3, 4,5 y 6 h). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.	148
Figura 59. PAGE-SDS y tinción posterior con nitrato de plata de las FP segregadas por las células de <i>S. scitamineum</i> a distintos tiempos de incubación. M, marcador de pesos moleculares; 1, FP producidas durante 1,5 h de germinación; 2, FP producidas durante 3 h de germinación; 3, FP producidas durante 4,5 h de germinación; 4, FP producidas durante 6 h de germinación.	148
Figura 60. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta FP producidas durante 1,5, 3, 4,5 y 6 h de germinación (en blanco) o arginasa semi-purificada a partir de las distintas FP (en morado). Los resultados correspondientes al efecto quimioattractante ejercido por las glicoproteínas HMMG y por la SCA de plantas control del cv. My 55-14 han sido añadidos para comparar los resultados de ambos ensayos. Un control, conteniendo agua en el capilar fue realizado (en negro en la Figura). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	149
Figura 61. Niveles de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa (β -1,3-glu) y β -1,4-glucanasa (β -1,4-glu) contenidas en las células fúngicas antes (en blanco) y después (en gris) del contacto con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	150
Figura 62. Ensayo de citoaglutinación en presencia de FP producidas tras 6 h de germinación (en blanco) y de arginasa fúngica semi-purificada (en morado). Un control, en ausencia de cualquier proteína fúngica fue incorporado (en negro). Los resultados se expresan como porcentaje de células implicadas en cada una de las distintas agrupaciones (teliosporas no agregadas, agregadas en grupos de 2 a 20 células, en grupos de 21 a 50 células, en grupos de 51 a 100 células o en grupos de más de 100 células). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.	150

- Figura 63. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes ($0-0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de glicoproteínas HMMG de plantas control del cv. 55-14 (\square), de FP producidas durante 6 h de germinación (\circ), de SCA pre-purificada a partir de las glicoproteínas HMMG (\blacksquare), de arginasa pre-purificada a partir de las proteínas fúngicas (\bullet), y, por último, en presencia de una mezcla equimolecular de FP y SCA (\blacktriangle). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.151
- Figura 64. Micrografías obtenidas por microscopía óptica que muestran las diferencias observadas entre el la germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de FP $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, donde la germinación alcanzada fue del 100%, (A), o en presencia de HMMG de plantas control del cv. My 55-14, donde la germinación disminuyó hasta valores mínimos(B). Las barras de escala indican 100 μm . Las flechas señalan la presencia abundante de esporidios en el medio de incubación tras la incubación con las FP.152
- Figura 65. Porcentaje de teliosporas ramificadas en ausencia (A) o en presencia (B) del total de FP liberadas durante las 6 primeras horas de germinación. Micrografía en campo claro obtenidas por microscopía óptica que muestran las ramificaciones encontradas tras la incubación en presencia de las FP. Las flechas señalan las ramificaciones. La barra de escala indica 10 μm (C).....153
- Figura 66. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de una concentración $0,14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de FP obtenidas tras distintos tiempos de. El ensayo fue llevado a cabo en ausencia (\bullet) o en presencia (\blacktriangle) de SCA en el mismo medio de incubación (mezcla equimolecular). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.153
- Figura 67. Porcentaje de fluorescencia retenida sobre la pared de las teliosporas tras la incubación con las proteínas AFA, IFA o SCA marcadas con FITC (a). Porcentaje de células que presentaban fluorescencia en su pared celular tras la incubación con las mismas proteínas (b). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$). Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia que muestran un grupo de teliosporas previamente incubadas en presencia de las proteínas AFA (c) o SCA (d) marcadas con FITC (*). Se muestra la imagen en campo claro con su correspondiente en fluorescencia. En ésta son señaladas las esporas que presentaron (numeración en negro/blanco) o no (numeración en rojo) fluorescencia tras la incubación. Las barras de escala indican 20 μm y 50 μm en (c) y (d), respectivamente.156

- Figura 68. Poder de desorción ejercido por las distintas arginasas sobre las demás. El resultado es expresado como el porcentaje de fluorescencia, previamente reteluida sobre la pared, que fue liberada al medio tras la incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).157
- Figura 69. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de AFA, IFA, parcial o totalmente inactivada, o SCA. Un control incubado en ausencia de arginasas fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).157
- Figura 70. Micrografías en campo claro (CC) y fluorescencia (FITC) obtenidas por microscopía óptica correspondientes a la localización de las proteínas IFA (A, B) o AFA (C, D, E) retenidas sobre la pared de las teliosporas de *S. scitamineum* tras 96 h de incubación. Las flechas rojas indican la presencia de ensanchamientos en la base de las hifas emergentes en presencia de IFA. Las flechas blancas señalan células con una distribución polarizada de AFA sobre la superficie celular.158
- Figura 71. Micrografías obtenidas por TEM de teliosporas de *S. scitamineum* recogidas del capilar tras los experimentos de quimioatracción en presencia de glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 como agente quimioattractante. Se muestra la estructura de teliosporas invaginadas (a y c). En b, ampliación de a, se corrobora la ausencia de estructuras móviles sobre la superficie celular, siendo apreciables unas pequeñas espículas. Las barras de escala indican 1,0 μm159
- Figura 72. Micrografías obtenidas por SEM de teliosporas de *S. scitamineum* recogidas del capilar tras los experimentos de quimioatracción en presencia de glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 como agente quimioattractante. Se muestra una espora invaginada (a), una teliospora germinando (b), un grupo de teliosporas aglutinadas en el capilar tras la quimioatracción (c) y una ampliación de la zona de contacto entre dos células, en las cuales puede observarse la ausencia de estructuras móviles en la pared celular, En todos los casos, las barras de error indican 1,0 μm160
- Figura 73. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de plantas control de B 42231 (a) o My 55-14 (b). Donde se indica, Fal 0,13 μM , Lat A 5 μM o Ble 13 μM fueron añadidos al medio de incubación. Un control en ausencia de inhibidores fue incorporado al ensayo. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).161

- Figura 74. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de plantas control de My 55-14. Donde se indica, Lat A 5 μ M, GDP β S 5 mM, GTP 50 mM o GTP γ S 22 mM fueron añadidos al medio de incubación. Un control en ausencia de inhibidores fue incorporado al ensayo. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 162
- Figura 75. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de plantas control de My 55-14. Donde se indica, Ble 13 μ M GDP β S 5 mM, GTP 50 mM o GTP γ S 22 mM fueron añadidos al medio de incubación. Un control en ausencia de inhibidores fue incorporado al ensayo. Las barras verticales indican el error estándar y las letras indican diferencias significativas entre medias tomando $p < 0,05$ 163
- Figura 76. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto (Lat A, Ble o Fal). Un control, correspondiente a teliosporas incubadas en agua fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) a lo largo de 18 h de incubación (a). Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes de Lat A (b), Ble (c) o Fal (d). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones 164
- Figura 77. Micrografías en campo claro obtenidas mediante microscopía óptica que muestran algunas de las imágenes visualizadas durante la germinación de las teliosporas en ausencia y presencia de los inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto. La micrografías corresponden al control (a) y a la incubación con Fal 5,78 μ M (b), Lat A 0,08 μ M y Ble 0,72 mM (c, d). La barra de escala indica en todos los casos 10 μ m.. 165
- Figura 78. Western Blotting de las fracciones (soluble, S, e insoluble, I) resultantes del lisado de una muestra de teliosporas para el cual se utilizaron anticuerpos específicos anti-actina de eucariotas. El control (C) utilizado correspondía a actina de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster.. 166
- Figura 79. Western Blotting de la fracción soluble resultante del lisado de una muestra (M) de teliosporas en el que se utilizaron anticuerpos específicos contra las cadenas pesadas de la miosina (*myosin heavy chains*, MH) IIA y IIB. Los controles (C) utilizados correspondían a MHIIA y MHIIB de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster. b) Western Blotting de la fracción soluble resultante del lisado de una muestra (M) de teliosporas en el que se utilizaron anticuerpos específicos contra

la cadena ligera de la miosina (<i>myosin light chain</i> , ML). El control (C) utilizado correspondía a ML de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster..	166
Figura 80. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondientes a una espora control, sin tratar con glicoproteínas HMMG o inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5µm.....	168
Figura 81. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondientes a una espora control, sin tratar con glicoproteínas HMMG o inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5µm.....	169
Figura 82. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de teliosporas tratadas con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 10 µm..	170
Figura 83. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondiente a una teliospora tratada con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5 µm..	171
Figura 84. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondiente a una teliospora tratada con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la	

resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5 µm.....	172
Figura 85. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal de una espora tratada con glicoproteínasHMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 y Lat A. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5 µm.....	173
Figura 86. Análisis a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de la distribución de la actina fluorescente en teliosporas previamente estimuladas por HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 en ausencia o en presencia de los inhibidores Fal, Lat A y Ble. Un control fue realizado en ausencia de HMMG y cualquier inhibidor. Se muestra el porcentaje de células que presentaron distribución asimétrica de la fluorescencia (a), la intensidad media de la emisión de fluorescencia por pixel (b), el valor correspondiente a la diferencia entre la intensidad máxima y mínima de fluorescencia (c) y la intensidad total de emisión de fluorescencia por célula (d). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar O,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).	174
Figura 87. Proyección en el eje Z de series de 8-10 microfotografías obtenidas por microscopía confocal que muestran la organización actínica y nuclear en distintos estadios durante la germinación de teliosporas de <i>S. scitamineum</i> . Se representa la organización previa a la germinación (A), migración del núcleo a lo largo de una hifa en crecimiento (B y C), esporidios haploides liberados (D), conjugación (E) y aparición de micelio infectivo (F). CC, campo claro; α-A, localización de la actina mediante la utilización de anticuerpos anti-IgG conjugados a Alexa Fluor-488, D; tinción nuclear con DAPI, M; merged o combinación. Las barras de escala indican 1,0 µm en A y B, 2 µm en D y 5 µm en C, E y F..	175
Figura 88. Micrografías obtenidas por TEM que muestran células no tratadas (A), estimuladas con HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (B, C) o incubadas en presencia de HMMG + Lat A 10 µM (D, E). La detección de la actina celular se hizo en presencia de anticuerpos anti β-actina unidos a ferritina. para la visualización de la actina por deposición del metal. Las flechas rojas señalan regiones con ferritina depositada, las flechas blancas indican la presencia de invaginaciones y la flecha negra la localización de cuerpos apoptóticos. En B y D se representa la	

ampliación de una región de la micrografía correspondiente. Las barras de escala indican 0,7 μm en las micrografías completas y 0,2 μm en las ampliaciones mostradas..	177
Figura 89. Proyección en el eje Z de series de 8-10 micrografías obtenidas por microscopía confocal que muestran la organización actínica y nuclear en las teliosporas de <i>S. scitamineum</i> tras incubación en presencia de Jas 5 y 10 μM , en presencia de glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas (A, B, C) e inoculadas del cv. My 55-14 (D, E, F) y por plantas no inoculadas (G) e inoculadas (H) del cv. B 42231. Se muestra un control, incubado en ausencia de agentes externos.. CC, campo claro; α -A, localización de la actina mediante la utilización de anticuerpos anti-IgG conjugados a Alexa Fluor-488, D; tinción nuclear con DAPI, M; <i>merged</i> o combinación; ND, núcleo descondensado. Las flechas indican marcaje polarizado. Las barras de escala representan 2 μm en control, Jas 10 μM , C, D, E, F y G. Las barras de escala indican 5 μm en Jas 5 μM , A y B..	180
Figura 90. PAGE-SDS y tinción posterior con nitrato de plata de tubulina semi-purificada (T) de teliosporas de <i>S. scitamineum</i> según el protocolo descrito en 3.5 de Material y Métodos. M; marcador de pesos moleculares.	180
Figura 91. Western Blotting de tubulina semi-purificada (M, muestra), utilizando un anticuerpo específico contra la tubulina acetilada. Los controles (C) utilizados fueron tubulina correspondiente a la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster (C1) y tubulina humana correspondiente a linfocitos T de la línea celular Jurkat (C2).....	181
Figura 92. Valoración de la polimerización de tubulina semi-purificada como incremento de la absorbancia a 350 nm en tampón polimerizante en presencia de concentraciones crecientes de Noc (0-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a lo largo del tiempo (0-90 min). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.	181
Figura 93. Micrografías obtenidas por microscopía confocal que muestran la organización microtubular en células control y tratadas con taxol 10 μM . La fluorescencia verde indica la inmunolocalización de la tubulina en presencia (columna de la izquierda) o ausencia (derecha) de luz de campo claro. Las barras de escala indican en todos los casos 2 μm .	182
Figura 94. Ensayo de germinación de teliosporas de <i>S. scitamineum</i> en presencia de concentraciones crecientes de Noc (0,5-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El efecto del inhibidor se valoró sobre el porcentaje de aparición de tubos germinativos (en blanco) y esporidios (en gris) en las muestras, incubadas sobre agar 0,1 % durante 15 h. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$), en cursiva para el porcentaje de tubos germinativos, en redonda para el porcentaje de esporidios liberados (a). Micrografías obtenidas mediante microscopio óptico	

que muestran el efecto inhibitorio del Noc ($8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre la germinación de las teliosporas, respecto a un control incubado en ausencia del inhibidor. Las barras de error indican $10 \mu\text{m}$ (b).....183

Figura 95. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de Noc y Lat A en agar 0,1% (p/v) a lo largo de 18 h de incubación. Se muestra el porcentaje de germinación total (GER T), referente a la aparición de tubos germinativos + esporidios, así como el porcentaje de esporidios liberados al medio (ES L), en ausencia (C, control) o en presencia de los inhibidores (Noc, Lat A). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones..184

Figura 96. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ést a HMMG del cv. My 55-14 en presencia de concentraciones crecientes ($0,125\text{-}2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de Noc. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).185

Figura 97. Variaciones en la aglutinación de las esporas en presencia de Noc. Los resultados se expresan como porcentaje de células implicadas en cada una de las distintas agrupaciones (teliosporas no agregadas, agregadas en grupos de 2 a 50 células, en grupos de 51 a 100 células, en grupos de 101 a 200 células o en grupos de más de 200 células). Las barras verticales representan el valor estándar asociado a cada medida y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).185

Figura 98. Porcentaje de células que presentaban asimetría en la organización de la F-actina en su citoplasma en ausencia (control) o en presencia de Noc $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).186

Figura 99. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia que muestran la distribución de los filamentos de actina, marcados con Fal-FITC, en células control o tratadas con Noc $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En cada caso, se muestra la imagen en campo claro y su correspondiente en fluorescencia. Las flechas rojas señalan las células polarizadas.....186

Figura 100. Micrografías obtenidas por microscopía confocal que muestran el efecto de las glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 sobre la migración nuclear de teliosporas de *S. scitamineum*. Se muestra la localización nuclear en células control (a) o tratadas (b) tras 9 h de incubación. Para a y b se muestran imágenes en campo claro junto a su correspondiente con fluorescencia DAPI, así como la imagen resultante al combinar ambas luces. Barra de escala, $5 \mu\text{m}$. EAN, esporidio anucleado.187

- Figura 101. Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células control, que no habían sido incubadas en presencia de HMMG. Se muestra una imagen en campo claro, su correspondiente con fluorescencia y la combinación de ambas. La barra de escala indica 5µm. CP, célula polarizada.....188
- Figura 102. Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células tratadas con HMMG de plantas control del cv. My 55-14. Se muestra una imagen en campo claro, su correspondiente con fluorescencia y la combinación de ambas. La barra de escala indica 5µm. CNP, célula no polarizada.....189
- Figura 103. Porcentaje de células que presentaban una distribución polarizada de los MT en ausencia (control) o en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) de los cvs. My 55-14 y B 42232. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).189
- Figura 104. Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células control, que habían sido incubadas en ausencia de HMMG (a). Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células tratadas con HMMG de plantas control del cv. My 55-14 (b). En (a) y (b) se muestra la imagen en campo claro, su correspondiente con fluorescencia-DAPI y la combinación de ambas. La barra de escala indica 5µm. NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado; NF, núcleo fragmentado...190
- Figura 105. Porcentaje de ocupación nuclear dentro del total de área celular (área nuclear/área total) en teliosporas no tratadas (control) o tratadas con HMMG de plantas control (C) o inoculadas (I) de los cvs. My 55-14 y B 4223. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).191
- Figura 106. Porcentaje de células no tratadas (control) o tratadas con glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) de los cvs. My 55-14 y B 42231 que contenían el núcleo condensado o fragmentado (parcial o totalmente) tras cada uno de los tratamientos.191
- Figura 107. Proyección en el eje Z de series de 8-10 micrografías obtenidas por microscopía confocal correspondientes a células control (a, b) y células tratadas con HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (c, d). En a, b, c y d se muestran las imágenes obtenidas por campo claro y fluorescencia, para el marcaje nuclear y la localización de la tubulina. Se muestra también la imagen resultante de la combinación de todas ellas (merged). Las barras de escala indican 5µm.

CP, célula polarizada; CNP, célula no polarizada; PMP, punto de máxima polaridad; NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado; NF, núcleo fragmentado	192
Figura 108. Micrografías obtenidas por microscopía confocal de células control y células tratadas con HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) del cv. My 55-14. En cada caso, se muestran las imágenes obtenidas por campo claro y fluorescencia para el marcaje nuclear (DAPI) y la localización de la α -tubulina. Se muestra también la combinación de ambas imágenes fluorescentes (α -tubulina + DAPI). Las barras de escala indican 2 μ m. CP, célula polarizada; CNP, célula no polarizada; NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado; NF, núcleo fragmentado..	193
Figura 109. Ensayo de germinación de teliosporas de <i>S. scitamineum</i> en presencia de concentraciones crecientes de PUT (0,1-10 mM). El efecto de la diamina se valoró sobre el porcentaje de aparición de tubos germinativos (en blanco) y esporidios (en gris) en las muestras, incubadas sobre agar 0,1 % durante 15 h. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$), en cursiva para el porcentaje de tubos germinativos, en redonda para el porcentaje de esporidios liberados..	194
Figura 110. Talla media (en μ m) de los tubos germinativos emergidos (TUB GER) y de los esporidios liberados (ES L) durante 15 h de germinación en presencia de concentraciones crecientes de PUT (0-10 mM). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), en cursiva para la talla de los tubos germinativos, en redonda para la talla de los esporidios liberados.	195
Figura 111. Ensayo de germinación de teliosporas de <i>S. scitamineum</i> en presencia de concentraciones crecientes (0,1-10 mM) de PUT (a) o SPD (b). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en cámara de Neubauer tras tiempos largos de incubación, entre 0 y 70 h . Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Micrografías obtenidas por microscopía óptica correspondientes a muestras de teliosporas no tratadas (b), tratadas con SPD 0,1 mM (c) y tratadas con PUT 10 mM (d). Las barras de error escala 10 μ m.	196
Figura 112. Valoración de la polimerización de tubulina semi-purificada como incremento de la absorbancia a 350 nm en tampón polimerizante en ausencia (control) o en presencia de PUT o SPD (0,1 y 7,5 mM) a lo largo del tiempo (0-150 min). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.	197

Figura 113. Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia correspondientes a células no tratadas (control) o tratadas con concentraciones crecientes de SPD (0,1 mM-10 mM) y posteriormente marcadas con DAPI para la localización de su material nuclear. Pueden observarse las imágenes en campo claro y sus correspondientes en fluorescencia. Las barras de escala indican 5 μ m. (NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado).....	197
Figura 114. Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia correspondientes a células no tratadas (control) o tratadas con concentraciones crecientes de PUT (0.1 mM-10 mM) y posteriormente marcadas con DAPI para la localización de su material nuclear. Pueden observarse las imágenes en campo claro y sus correspondientes en fluorescencia. Las barras de escala indican 5 μ m. (NC, núcleo condensado; PCF, pared celular fragmentada; MNL, material nuclear liberado; PP, protoplasto; ND, núcleo descondensado)..	198
Figura 115. Electroferograma obtenido mediante CE correspondiente a una inyección del tampón utilizado como electrolito. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 14.3 de Material y Métodos.	199
Figura 116. Electroferograma obtenido mediante CE correspondiente a la inyección de una mezcla de patrones comerciales (PUT, SPD y SPM), cada uno a concentración 0,033 mg·mL ⁻¹ . a, b y c señalan los picos del tampón electrolito. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 7 de Material y Métodos.....	199
Figura 117. Ecuaciones correspondientes a las rectas de calibración de las PAs comerciales (PUT, SPD y SPM) realizadas a partir de concentraciones variables de cada uno de ellas.	200
Figura 118. Electroferograma obtenido mediante CE, correspondiente a la inyección de una muestra que contenía las PAs conjugadas e insolubles en ácido (fracción PH) de la fracción interna de teliosporas previamente incubadas en presencia de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14. a, b y c señalan los picos del tampón electrolito. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 7 de Material y Métodos. Los picos obtenidos tras la separación se identificaron con PUT, SPD y SPM..	200
Figura 119. Niveles de PAs (PUT, SPD y SPM) detectados tras la incubación de teliosporas de <i>S. scitamineum</i> con HMMG producidas por plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) de los cvs. My 55-14 y B 42231. Se muestran los niveles de PAs dentro de las teliosporas (fracción interna) y de PAs segregadas (fracción segregada). Dentro de cada una de ellas se especifica la cantidad de PAs libres solubles en ácido o conjugadas insolubles en ácido. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones, las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	201

- Figura 120. Tinción Coomassie de los geles resultantes tras la separación electroforética de las glicoproteínas MMMG (A) y HMMG (B) de caña de azúcar. Para ambas separaciones: la primera calle corresponde al patrón de pesos moleculares, la segunda a glicoproteínas del cv. sensible (B 42231) y la tercera a glicoproteínas del cv. resistente (My 55-14).203
- Figura 121. Análisis de la expresión genética, mediante PCR cuantitativa (qPCR), de *SofCAD* en tejido meristemático de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 3 ó 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).207
- Figura 122. Análisis de la expresión genética, mediante qPCR de *SofCAD* en tejido foliar de plantas de los cvs. My 55-14 (A) y B 42231 (B) de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).207
- Figura 123. Análisis de la expresión genética, mediante qPCR de *SofDIR16* en tejido meristemático de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 3 ó 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).208
- Figura 124. Análisis de la expresión genética, mediante qPCR de *DIR16* en tejido foliar de plantas de los cvs. My 55-14 (A) y B 42231 (B) de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).209
- Figura 125. Electroferograma, obtenido por CZE, de la separación de una mezcla de patrones de lignanos ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ cada uno de ellos) entre los 3 y los 6 min. Se indica el tiempo de migración de cada uno de los lignanos separados (isolariciresinol, secoisolariciresinol, lariciresinol, matairesinol, pinioresinol). La detección se realizó a 200 nm. El resto de las condiciones de análisis se describen en el apartado 15.5 de Material y Métodos.210

- Figura 126. Ecuaciones correspondientes a las rectas de calibración de cada patrón de lignano comercial realizadas a partir de concentraciones variables de cada uno de ellos.211
- Figura 127. Electroferogramas, obtenidos mediante CZE, de los lignanos aislados a partir de tejido meristemático de caña de azúcar. Se muestra la separación de la mezcla de lignanos obtenida a partir del meristemático de plantas del cv. resistente sin inocular (A), inyectadas con agua (B) o con esporidios conjugantes (C). De igual manera, se presentan los electroferogramas obtenidos a partir de plantas del cv. sensible sin inocular (D), inyectadas con agua (E) o con esporidios (F). En el "inset" de la Figura D se muestra el resultado de la separación del extracto de lignanos obtenido a partir de plantas control del cv. B 42331 tras su cebamiento con 2 μL de pinoresinol y secoisolariciresinol ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). En cada caso, se indica el lignano que fue detectado, así como su tiempo de migración correspondiente. S, secoisolariciresinol; P, pinoresinol; M, matairesinol; I, isolariciresinol. La detección se realizó a 200 nm. El resto de las condiciones de análisis se describen en el apartado 15.5 de Material y Métodos.212
- Figura 128. Porcentaje de aparición de tubos germinativos (A) y esporidios libres (B) a partir de teliosporas incubadas en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes de pinoresinol ($5\text{-}40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 80 h de ensayo. El porcentaje de germinación total, consecuencia de la aparición tanto de tubos como de esporidios, se muestra en la Figura C. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Se indica también el nivel de significación (calificado arbitrariamente) del micelio dicariótico encontrado en las muestras en presencia de concentraciones crecientes ($0\text{-}40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinoresinol durante los ensayos de crecimiento del patógeno en sus estadios iniciales (hasta 72 h de incubación). Antes de las 9 h no se apreció la aparición de micelio en ningún caso (D).216
- Figura 129. Porcentaje de aparición de tubos germinativos (A) y esporidios libres (B) a partir de teliosporas incubadas en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes de secoisolariciresinol ($5\text{-}40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 80 h de ensayo. El porcentaje de germinación total, consecuencia de la aparición tanto de tubos como de esporidios, se muestra en la Figura C. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Se indica también el nivel de significación (calificado arbitrariamente) del micelio dicariótico encontrado en las muestras en presencia de concentraciones crecientes ($0\text{-}40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinoresinol durante los ensayos de crecimiento del patógeno en sus estadios iniciales (hasta 72 h de incubación). Antes de las 9 h no se apreció la aparición de micelio en ningún caso (D).217
- Figura 130. Micrografías tomadas al microscopio óptico de las teliosporas de *S. scitamineum* incubadas en ausencia (A, control) o en presencia de concentraciones crecientes ($5\text{-}40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de secoisolariciresinol (B) o pinoresinol (C). Las fotografías fueron tomadas durante los ensayos de germinación realizados en cámara de Neubauer (Figuras 128 y 129). Las flechas rojas

- señalan la aparición en el medio de esporidios con morfología alterada y las azules muestran la presencia de micelio dicariótico. Las barras de escala indican 10 μm en A1, A2, B4, C1 y C2, 20 μm en B1, B2, B3 y B6 y 100 μm en B5 y C3..218
- Figura 131. Micrografías tomadas al microscopio óptico correspondientes a esporidios conjugantes (+ y -) de *S. scitamineum* teñidos con safranina, para el marcaje de su material nuclear. Previo al marcaje, los esporidios sexualmente compatibles (+ y -) habían sido incubados conjuntamente en ausencia (A) o en presencia de pinoresinol 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B y C) o secoisolariciresinol 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D y E). Las barras de escala indican 10 μm219
- Figura 132. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo concentraciones crecientes (entre 5 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinoresinol (A) o secoisolariciresinol (B). Las fotografías fueron tomadas a las 48, 72 y 96 h Las barras de escala indican 1 mm.220
- Figura 133. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios compatibles (+ y -) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo concentraciones crecientes (entre 5 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinoresinol (A) o secoisolariciresinol (B). Las fotografías fueron tomadas a las 24, 48, 72 y 96 h. Las barras de escala indican 1 mm.221
- Figura 134. Micrografías obtenidas por microscopía óptica correspondientes a una muestra de esporidios aislados (+) de *S. scitamineum* teñidos con azul de lactofenol, para el marcaje del citoplasma y la quitina de la pared celular. La muestra de esporidios para la tinción fue tomada del borde de una colonia que estaba creciendo en ausencia (A) o en presencia de pinoresinol 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C y D) o secoisolariciresinol 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B). Las barras de escala indican 10 μm222
- Figura 135. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) en ausencia (control) o en presencia de pinoresinol 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El ensayo fue realizado para una concentración de esporidios de $2,6\cdot 10^6$ esporidios $\cdot\text{mL}^{-1}$ y para una dilución 1/1000 (v/v) de esa concentración. Las fotografías fueron tomadas a las 30, 45, 67 y 92 h. Las barras de escala indican 1 mm.222
- Figura 136. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios conjugantes (+ y -) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) en ausencia (control) o en presencia de pinoresinol 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El ensayo fue realizado para una concentración de esporidios de $2,6\cdot 10^6$ esporidios $\cdot\text{mL}^{-1}$ y para una dilución 1/1000 (v/v) de

esa concentración. Las fotografías fueron tomadas a las 30, 45, 67 y 92 h. Las barras de escala indican 1 mm..	223
Figura 137. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+), a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^3$ esporidios·mL ⁻¹ , en secciones de medio PDA al 4,2% (v/v). Se muestra el progreso de una colonia control (a y b, a las 72 y a las 96 h, respectivamente) y de una colonia creciendo en presencia de pinoresinol 100 µg·mL ⁻¹ (a las 72 y 96 h, c y d, respectivamente). Las flechas blancas y azules señalan la presencia de la morfología típica de las colonias control e incubadas con pinoresinol, respectivamente. Las barras de escala indican 0,5 mm.	223
Figura 138. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios compatibles (+ y -), a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^3$ esporidios·mL ⁻¹ , en secciones de medio PDA al 4,2% (v/v). Se muestra el progreso de una colonia control (a y b, a las 72 y a las 96 h, respectivamente) y de una colonia creciendo en presencia de pinoresinol 100 µg·mL ⁻¹ (c y d, a las 72 y 96 h, respectivamente). Las flechas blancas y azules señalan la presencia de la morfología típica de las colonias control e incubadas con pinoresinol, respectivamente. Las barras de escala indican 0,5 mm.	224
Figura 139. Cantidad de proteínas (mg de proteína·mg de peso fresco ⁻¹) producidas durante el crecimiento de una colonia de esporidios no compatibles (+) en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes (entre 5 y 40 µg·mL ⁻¹) de pinoresinol (A). Cantidad de proteínas (mg de proteína·mg de peso fresco ⁻¹) producidas durante el crecimiento de una colonia de esporidios compatibles (+ y -) en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes (entre 5 y 40 µg·mL ⁻¹) de pinoresinol (B). El contenido de proteínas fue valorado a diferentes tiempos de incubación (0-144 h). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.	225
Figura 140. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+), (A), y de esporidios compatibles (+ y -), (B), en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes (5-40 µg·mL ⁻¹) de una mezcla de lignanos conformada por pinoresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol e isolariciresinol. Las fotografías fueron tomadas a las 24, 48 y 72 h. En A, la flecha azul señala la presencia de un borde definido en la muestra control. En B, la flecha roja señala la ausencia de borde en algunas de las colonias observadas. Las barras de escala indican 1 mm..	226
Figura 141. Micrografías obtenidas mediante microscopio de fluorescencia correspondientes a esporidios aislados (+) incubados en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes (5-	

40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de una mezcla de lignanos conformada por pinoresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol e isolariciresinol, y posteriormente teñidos con DAPI. Las flechas verdes señalan la presencia de núcleos condensados en las células y las flechas rojas la presencia de núcleos descondensados o fragmentados por todo el citoplasma celular. Las barras de escala indican 10 μm227

Figura 142. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) y esporidios compatibles (+ y -) (B) incubados en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo un extracto de lignanos procedente del tejido meristemático de plantas de caña de azúcar de los cvs. resistente (My 55-14) o susceptible (B 42231), en ausencia del patógeno (C, control) o previamente inoculados (I, inoculado) con el patógeno. Una colonia control creció en ausencia de extracto de lignanos. Las fotografías fueron tomadas a las 24, 48, 72 y 96 h. Las barras de escala indican 2mm..229

Figura 143. Cantidad de proteínas (mg de proteína·mg de peso fresco⁻¹) producidas durante el crecimiento de una colonia de esporidios aislados (+), (A), o compatibles (+ y -), (B), en ausencia (control) o en presencia de extractos de lignanos obtenidos a partir de tejido meristemático de plantas no inoculadas (C, control) o inoculadas con esporidios compatibles (I, inoculadas) de los cvs. My 55-14 y B 42231. El contenido de proteínas fue valorado a diferentes tiempos de incubación (0-144 h). Las barras verticales indican el error estándar asociado a cada medida.230

Figura 144. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) en medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo extractos de lignanos aislados a partir de tejido meristemático de plantas control (C), inyectadas con agua (A, agua) o inoculadas con el patógeno (I, inoculadas) de los cvs. resistente (My 55-14) o susceptible (B 42231). Las imágenes fueron tomadas a las 72 y 96 h. Las barras de escala indican 1mm (A). Porcentaje de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en ausencia (Control) o en presencia de extractos de lignanos de tejido meristemático de plantas control, inyectadas con agua (A,) o inoculadas con el patógeno (I) de los cvs. resistente o susceptible. En la germinación, se diferencia entre la aparición de tubos germinativos (color intenso) o esporidios libres (color pálido) (B). Niveles de pinoresinol y secoisolariciresinol detectados por CZE (ver Tabla XI) (C). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.232

Figura 145. Esquema de la secuencia temporal de eventos (indicados como 1-4) desencadenados por la quimiotracción inducida por el gradiente de glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. resistente.....243

- Figura 146. Esquema que representa la unión de las SCAs de los cvs. My 55-14 (A) y B 42231 (B) a su ligando en la pared de las teliosporas. En presencia de una baja concentración de la enzima, ambas proteínas se unen a la superficie celular, lo que conlleva la inhibición de la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* (ver Figura 47). Con una alta concentración de SCA de My 55-14, la cual se une fuertemente a su ligando de pared, se intensifica el efecto negativo sobre la germinación al producirse un mayor número de uniones eficaces ligando-proteína. En presencia de una alta concentración de SCA de B 4223 se revierte el efecto negativo de la enzima sobre la germinación debido a la competencia entre las moléculas, que se unen débilmente a su ligando de pared y se desplazan las unas a las otras fácilmente. Representando (●) las teliosporas del carbón, (■) el ligando de pared para la arginasa, (●) la SCA de My 55-14 y (●) la SCA de B 42231.245
- Figura 147. Esquema modificado de Zhang *et al.* (2011) que representa la producción de NO y PAs. 247
- Figura 148. Esquema que representa los efectos que desencadenan la unión de la SCA del cv. B 42231 o la SCA del cv. My 55-14 a su ligando de pared de las teliosporas. Representando (■) las plantas de caña de azúcar, (●) las teliosporas del carbón, (■) el ligando de pared para la arginasa, (●) la SCA de My 55-14, (●) la SCA de B 42231 y (●) la arginasa fúngica.254
- Figura 149. Esquema que representa cómo la presencia de Ble podría desencadenar la activación de la GTPasa Rac por medio de la liberación de sus GEF. La actividad de Rac-GTPasa bloquearía la fosforilación de la miosina por la quinasa correspondiente. A su vez, la inhibición de la GTPasa Rac estimularía la activación de la GTPasa Rho y la polimerización de la actina. Representando (■) la miosina II y (●) los monómeros de actina.258
- Figura 150. Hipótesis del movimiento de las teliosporas de *S. scitamineum* durante su desplazamiento por quimiotaxis, basado en continuos ciclos de translocación hacia el plano ecuatorial (A) y posterior polimerización hacia el polo de avance (B) de los filamentos de actina. Representando (■) la miosina II, (●) la actina G, (■) la F-actina, (→) la dirección del flujo retrógrado, (+) el extremo más del filamento de actina y (-) el extremo menos del filamento de actina. El proceso completo es detallado en el texto.259
- Figura 151. Esquema que representa la organización de la actina durante las primeras etapas de germinación de teliosporas de *S. scitamineum*. 1) Aglutinación de las teliosporas en el punto de infección, donde se dispara la germinación. 2) Adelgazamiento de la pared celular y 3) pérdida de la actina cortical. El núcleo migra hacia el polo germinativo. 4) Emergencia de la hifa y 5) translocación del núcleo hacia el interior del tubo germinativo. 6) Liberación de esporidios y 7) división de los mismos por gemación. 8) Conjugación de esporidios compatibles (+ y -). 9) Formación y (10) crecimiento de micelio dicariótico.261

Figura 152. Esquema que representa la organización de los MT durante las primeras etapas de germinación de teliosporas de *S. scitamineum*. Ausencia de polarización microtubular al comienzo de la germinación (1), establecimiento de un punto de máxima polaridad (PMP) para los MT correspondiente a la localización del poro germinativo (2), polarización de los MT en la célula que posicionan al núcleo en la base de la hifa emergente (3), translocación del núcleo a través del poro germinativo (4), Desplazamiento nuclear a lo largo del tubo germinativo (5,6) (A). Micrografías obtenidas por microscopía confocal y correspondientes con cada uno de los estadios descritos en (A) que muestran la localización por fluorescencia del núcleo (en azul) y la α -tubulina (en verde) en teliosporas incubadas en agua destilada. La barras de escala indican 2 μ m (B).264

Figura 153. Esquema que representa el papel que las SCAs producidas por plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231 podrían desempeñar en el establecimiento de la infección por *S. scitamineum*. La enzima producida por el cv. resistente (que se sintetiza en su configuración activa) se uniría tempranamente a su ligando de pared de las teliosporas evitando la germinación y la producción de arginasa fúngica. Sin embargo, la SCA (inactiva) producida por las plantas del cv. susceptible, no podría evitar la germinación ni la producción de arginasa fúngica. Esta última estimularía la infección en las plantas de B 42231.267

Figura 154. Producción de PAs en esporas no tratadas con HMMG durante su germinación. Liberación de arginasa por las teliosporas en los primeros estadios de germinación (1). La unión de la arginasa a su receptor en la pared de las células fúngicas conlleva su citoaglutinación y la formación del quórum (2). Internalización de la arginasa (3) y producción de PUT a partir de ARG por acción de la arginasa (no se muestra la ornitina, molécula intermediaria para la síntesis de PUT) (4). Niveles moderados de SPD interaccionan con el citoesqueleto, estimulando su polimerización (5). El exceso de PUT es liberado, estimulando en otras células vecinas la liberación de esporidios potencialmente infectivos (6). El exceso de SPD puede ser liberado al medio (7). ARG, arginina.273

Figura 155. Producción de PAs en esporas tratadas con HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14. Liberación de SCA por las plantas de caña de azúcar (1), unión de SCA a su ligando de pared (2), la cual estimula los procesos de citoaglutinación y falso quórum (3) e internalización de SCA (4). La SCA activa cataliza la síntesis de grandes concentraciones de PAs en el interior celular a partir de ARG (5). El exceso de PAs es derivado hacia su conjugación con moléculas grandes, altamente cargadas negativamente, como el citoesqueleto o los ácidos nucleicos (6). Parte del exceso de PAs se elimina por medio de su secreción al medio (7). El exceso de PUT causa la liberación de protoplastos tras la rotura de las paredes celulares (8), la liberación al medio del contenido nuclear y citoplasmático (9) y la muerte celular. ARG, arginina.274

Figura 156. Esquema del proceso de interacción entre las plantas del cv. My 55-14 y *S. scitamineum* durante los primeros estadios de la infección, por medio de la producción de HMMG. En azul, los eventos que se suceden durante el establecimiento de la señal de falso quórum (A). En rojo, los procesos que se desencadenan si las teliosporas comienzan a germinar y producen la señal de quórum que establece la infección (B). En verde, la elicitación de una respuesta específica de defensa por parte de las plantas, tras la detección de la presencia del patógeno (C). Representando (🌱) las plantas de caña de azúcar del cv. My 55-14, (🍄) las teliosporas del carbón, (🔵) la proteína quimioattractante en las HMMG, (🟡) la SCA, (🟠) la proteína quimioattractante en las FP y (🟣) la arginasa fúngica. Aquellos sucesos que se ha comprobado que no se desencadenan de igual manera por las HMMG de plantas del cv. susceptible y que, por tanto, podrían ser clave en la resistencia de My 55-14 son indicados con asterisco (*).....286

Tabla I. Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Gabriel y Galán, 2002).	19
Tabla II. Clasificación taxonómica del patógeno <i>Sporisorium scitamineum</i>	21
Tabla III. Características de las columnas utilizadas para la separación de glicoproteínas de caña.	67
Tabla IV. Ensayo de quimiotaxis en relación al quimioattractante utilizado, los agentes adicionados al medio, los controles incluidos para cada ensayo y el tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 10. *Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. **Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).	89
Tabla V. Ensayo de citoaglutinación en relación al agente adicionado al medio, los controles incluidos para cada ensayo y el tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 11. *Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).	92
Tabla VI. Proporciones de acetona y resina necesarias para la correcta inclusión de las muestras. También se indica el tiempo en que éstas deben mantenerse en cada una de las proporciones.	105
Tabla VII. Ensayo de germinación en agar al 0,1% (p/v) en relación al agente adicionado al medio y al tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 13. *Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. **Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).	107
Tabla VIII. Variaciones incorporadas en cada ensayo para el análisis del crecimiento y la conjugación de colonias de esporidios de <i>S. scitamineum</i> sobre medio PDA al 4,2% (p/v) en relación al inóculo, al agente adicionado al medio y al tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 17.* Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. ** Análisis posteriores a partir de las colonias en crecimiento.	121
Tabla IX. Niveles de actividad arginasa utilizados en los experimentos de competencia entre las diferentes formas de arginasa. Se muestran los valores de actividad inicial de la SCA semi-purificada, así como de la arginasa fúngica contenida en las FP-6h. Esta última fue inactivada en presencia de Hg ²⁺ , haciendo falta dos incubaciones para lograr la inactivación completa de la actividad enzimática.	155
Tabla X. Identificación de las proteínas contenidas en MMMG (A) y HMMG (B) por búsqueda en las bases de datos NCBI con el servidor MASCOT. Para cada una de las bandas se identificaron varias posibles proteínas, de las que se indica su código de acceso, su descripción, el origen, la masa molecular, la puntuación y la cobertura.	204

Tabla XI. Niveles de isolariciresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol y pinoresinol detectados en el tejido meristemático de plantas de caña de azúcar del cv. resistente (My 55-14) y sensible (B 42231) no inoculadas (control, C), inyectadas con agua (A) o inoculadas con el patógeno (I). La cuantificación es expresada como μg de lignano por gramo de tejido fresco.	213
---	-----

ADC: Arginina descarboxilasa	ET: Etileno
ADN: Ácido desoxirribonucleico	Fal: Faloidina
ADNc: ADN complementario	FITC: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
AFA: <i>Active Fungal Arginase</i>	FP: <i>Fungal Proteins</i>
ANOVA: Análisis de la varianza	F5H: Ferulato 5-hidroxilasa
ARN: Ácido ribonucleico	GAP: <i>GTPase activating proteins</i>
ATP: Adenosín trifosfato	GEF: <i>Guanosine nucleotide exchange factors</i>
B: Barbados	GDI: <i>GDP-dissociation inhibitor</i>
Ble: Blebistatina	GDP: Guanosin difosfato
Br-CN: Bromuro de cianógeno	GDP β S: Guanosin 5'-(β -thio) difosfato
BSA: <i>Bovine serum albumine</i>	GTP: Guanosin trifosfato
CAD: Cinamil alcohol deshidrogenasa	GTP γ S: Guanosin 5'-O-(γ -tio)trifosfato
CE: <i>Capillary electrophoresis</i>	HMMG: <i>High molecular mass glycoproteins</i>
CCR: Cinamoil CoA reductasa	HR: Respuesta hipersensible
Con A: Concanavalina A	HSD: <i>Honestly significant difference</i>
Cv: Cultivar	IFA: Arginasa fúngica inactivada (<i>Inactivated Fungal Arginase</i>)
Cvs: Cultivares	JA: Jasmonato
CZE: <i>Capillary zone electrophoresis</i>	Jas: Jasplaquinolida
C3H: <i>p</i> -cumarato 3-hidroxilasa	Lat A: Latrunculina A
C4H: Cinamato 4-hidroxilasa	MES: Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico
DABCO: 1,4-diazobiciclo[2.2.2]octano	MH: <i>Myosin heavy chain</i>
DIR: Proteínas dirigentes	ML: <i>Myosin light chain</i>
IgG: Inmunoglobulina G	MT: Microtúbulos
EGTA: Ácido etilen glicol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N' tetraacético	MMMG: <i>Mid molecular mass glycoproteins</i>
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	MTSB: <i>Microtubule Stabilizing Buffer</i>
DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol	My: Mayarí
DMSO: Dimetil sulfóxido	NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
DTT: Ditiotreitól	NO: Óxido nítrico
EE: Error estándar	

NOS: Óxido nítrico sintasa	SEM: <i>Scanning Electron Microscopy</i>
Noc: Nocodazol	SPD: Espermidina
ODC: Ornitina descarboxilasa	SPM: Espermina
OMT: <i>o</i> -metiltransferasa	TCA: Ácido tricloroacético
PA: Poliamina	TEM: <i>Transmission Electron Microscopy</i>
PAGE: <i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>	TEMED: N',N', N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
PAL: Fenilalanina amonio liasa	TRIS: Tris-hidroximetil-aminometano
PAMPs: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>	V ₀ : Volumen muerto
PBS: Tampón fosfato sódico	V _t : Volumen total
PCR: <i>Polymerase chain reaction</i>	TBS: Tampón Tris-salino
PDA: <i>Potato dextrose agar</i>	4CL: 4-hidroxicinamoil CoA ligasa
PIPES: Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico))	
PLR: Pinoresinol-lariciresinol reductasa	
PMP: Punto de máxima polaridad	
PR: proteínas relacionadas con la patogénesis	
PUT: Putrescina	
PVDF: difluoruro de polivinilideno	
PVP: Polivinilirrolidona	
QSMs: <i>Quorum-sensing molecules</i>	
(genes) R: genes específicos de resistencia	
Rf: <i>Retention factor</i>	
ROS: Especies reactivas de oxígeno	
SA: Ácido salicílico	
SAD: Sinapil alcohol deshidrogenasa	
SAR: Sistemas adquiridos de resistencia	
SCA: <i>Sugar cane arginase</i>	
SDS: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>	

Summary/Resumen

SUMMARY

INTRODUCTION

Sugar cane is one of the most important commercial crops cultivated throughout the world, mostly in tropical/sub-tropical countries. It is the main source of crystal sugar (Sundar *et al.*, 2015). On the other hand, smut is a major disease of sugar cane caused by the filamentous fungus *Sporisorium scitamineum* (Sydow, 1924). In the early stages of the disease, spore germination occurs on the internode surface of sugar cane stalks, followed by the formation of appressoria, mainly on the inner scale of young buds and on the bases of emerging leaves (Waller, 1970). Penetration into the meristem in the bud occurs between 6 and 36 hours after the teliospores are deposited on the surface (Alexander and Ramakrishnan, 1980).

Since the pathogen can use the opened stomata of the host leaves to penetrate in the internal tissues, it is necessary to think that the teliospores deposited at random on the surface of a leaf, far from stomata, should develop a mechanism of displacement toward the way of entry, as suggested by Santiago *et al.* (2012). For this rationale, it is important to demonstrate the existence of these mechanisms and to study how they can be carried out. Brand and Gow(2012)

summarize the current knowledge on spore movement in plant–pathogen interactions.

The two most frequently suggested mechanisms are submicroscopical contractions of helically arranged fibrils within the cell walls and the occurrence of motile appendages in zoospores. Other species of pathogenic fungi produce spores that are able of gliding. Gliding is a form of cell movement that differs from crawling or swimming in which it does not rely on any obvious external organ or change in cell shape and it occurs only in the presence of a substrate. When fungal hyphae are the ones responsible to carry out the penetration into the host tissues, thigmotropism induces hyphal growth following the depressions between epidermal cells surrounding stomata.

One of the most obvious changes during pathogen teliospore germination is the establishment of cytoplasmic polarity (Fontaniella *et al.*, 2002). Hyphae of filamentous fungi are the extremely polarized cells: the continuous movement of vesicles from the teliospore cytoplasm through the hyphal cell body to the growing hyphal tip is essential for mycelium development (Fischer *et al.*, 2008; Baumann *et al.*, 2012). For this reason, the cytoskeleton of fungal cells plays a crucial role in polarity establishment, its maintenance and the polar growth of the

cell. Microtubules support nuclei division and long-distance-transport functions in filamentous fungi, whereas actin microfilaments are required for localized targeting events (Xiang and Plamanny, 2003). Moreover, alterations in the dynamics of microtubules leading to alterations to the shape and size of the nucleus are usually related to cell differentiation, but also to cell damage (Wilson and Jordan, 1995; Mollinedo and Gajate, 2003; Salinas *et al.*, 2014; Briceño *et al.*, 2015) and disease (Jevtić *et al.*, 2014). In general, nuclear fragmentation is related to cell death (Farage-Barhom *et al.*, 2011; Domínguez & Cejudo, 2015).

Resistance to smut disease by sugar cane plants is a multifactorial process. The response phase includes accumulation of different compounds such as phytoalexins (i.e. low molecular mass antimicrobial compounds that accumulate at sites of infection); systemic enzymes that degrade pathogens (e.g. chitinases, β -1,3-glucanases and proteases); systemic enzymes that generate antimicrobial compounds and protective biopolymers (e.g. peroxidases and phenoloxidases); biopolymers that restrict the spread of pathogens (e.g. hydroxyprolinerich glycoproteins, lignin, callose); and regulators of the induction and/or activity of defensive compounds (e.g. elicitors of plant and microbial origin, immune signals from primed plants and compounds, which release immune signals) (Kuc, 1990).

Resistant sugar cane plants naturally produce defence glycoproteins that accumulate in the parenchymatous cells of stalks. These glycoproteins, which have been defined as macromolecules of medium and high molecular weight (MMMGS, Mid-Molecular Mass Glycoproteins and HMMGS, High-Molecular Mass Glycoproteins) induce homotypic adhesion and inhibit teliospore germination of smut teliospores (Fontaniella *et al.*, 2002; Millanes *et al.*, 2005b). This effect on germination could be related to the inhibition of the germinative tube emergence as a result of cytoskeleton disruption and teliospore aggregation (Fontaniella *et al.*, 2002) by arginase activity contained in HMMGS. Arginase, which catalyzes ornithine production from arginine, is traditionally linked to polyamines biosynthesis (Walters, 1995).

Many researchers have highlighted the obvious correlation between fungal pathogenicity and polyamines accumulation (Rajam *et al.*, 1985; West and Walters, 1989; Walters, 2003). On the other hand, it is well established that polyamines are essential for growth and development of plants. They are involved in important physiological processes (Gill & Tuteja, 2010) such as in tolerance against biotic and abiotic stress (Gupta *et al.*, 2013; Gill & Tuteja, 2010). Defensive role of polyamines could also be a consequence of their binding to some molecules inside the cells, being

able to disable important processes for the pathogen development. It is possible because of the polycationic nature of polyamines at physiological pH values. Polyamines are able to bind strongly to existing negative charges in different cellular components, such as nucleic acids, proteins and phospholipids (Gupta *et al.*, 2013).

Other defense mechanisms occurs in plants. For example, lignification increases in a lot of plant organisms as a consequence of a stress situation. Lignins and lignans are produced by partition of the monolignols pool, *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol, towards specific biosynthetic pathways (Lewis and Yamamoto, 1990; Lewis and Davin, 1999; Lewis *et al.* 1999). The production of dimers and trimers from monolignols requires guidance proteins (DIR proteins), a family of proteins, exclusive of plants, involved in the production of lignins and in response to the invasion by pathogenic organisms and abiotic stresses. These proteins are responsible for the stereo-selective coupling of monolignol radicals to produce lignan or lignin. Lignins are structural cell wall components, whereas lignans are ubiquitous molecules involved in plant defence (Davin and Lewis, 2000).

OBJETIVES

The main objective of this project is about obtaining knowledge on the early sugar cane defence mechanisms triggered by HMMG that involve fungal cytoskeleton reorganization in smut teliospores. Based on this primary objective, a series of partial objectives listed below are proposed:

- Analysing chemoattractive and cytoagglutinant effect of HMMG from sugar cane on *Sporisorium scitamineum* teliospores and its relation to sugar cane defence.
- Considering the role of enzymatic activity contained in HMMG in plant resistance.
- Realizing a comparative analysis of fungal proteins segregated during germination and HMMG composition.
- Evaluating the role of cytoskeleton on fungal movement and germination and analyze the effect that glycoproteins cause on its reorganization.
- Analysing the role of dirigent proteins and lignans production and accumulation in early sugar cane defence against *Sporisorium scitamineum* attack.

RESULTS

From our results, we propose that, according to their biological function, at

least three classes of glycoproteins exist in the sugar cane HMMG produced by resistant cvs.: i) a chemotactic glycoprotein, yet uncharacterized; ii) a cytoagglutinating factor endowed with arginase activity, which also inhibits germination; and iii) at least three enzymatic proteins that mediate the breakdown of the teliospore cell wall (β -1,3- and β -1,4-glucanases, and chitinase). Chemotaxis and aggregation of smut teliospores by HMMG can be envisioned as a defensive mechanism. The aggregation would trap the teliospores in a small region in contact with the HMMG, which would increase their accessibility to the cell walls and facilitate the enzymatic activities of the HMMG to degrade the trapped teliospores.

Surprisingly, teliospores of *S. scitamineum* also secrete their own arginase. However, the fungal arginase activates a signal transduction cascade that accelerates teliospore germination when it binds to its cell wall. Thus, teliospore agglutination without germination triggered by sugar cane arginase becomes the result of a false quorum signal that prevents teliospore infection.

Polarization of cytoskeleton occurs during teliospore movement and germination. Arginase produced by resistant cvs. to smut disease is

responsible for preventing germination by means of polyamines increase in teliospores. Polyamines interact with cytoskeleton and provoke nuclear decondensation and cellular damage. Interestingly, polyamines levels do not increase in teliospores after incubation with HMMG produced by non resistant variety (Barbados 42231) which could be related to the incapacity of these plants to defend themselves against smut disease.

Active arginase is produced in healthy and resistant plants; conversely, it is not detected in the juice from susceptible cvs., which explains why microtubules depolarization, nuclear disorganization as well as germination of teliospores are not significantly affected by glycoproteins from non-resistant plants.

Moreover, resistant plants activate specific defensive mechanisms after infection that involve lignans biosynthesis. Constitutively, tissues of resistant cv. (My 55-14) of sugar cane have a higher level of transcripts for dirigent proteins (*SofDir*) than the susceptible cv. (B 42231). The inoculation with smut sporidia stimulates a differential defense response in relation to *SofDir* expression depending on the cv. This is, decreased expression of *SofDir* in My 55-14 and increased expression in B 42231. Absence of DIR in resistant plants derives

to lignans production which possess antimicrobial activity.

CONCLUSIONS

The conclusions of this project are listed below:

1. Plants of resistant to smut disease cv. (My 55-14) produce defensive glycoproteins that stimulate chemoattraction and cytoagglutination of teliospores. Agglutination of a lot of cells in a small region in contact with these glycoproteins confers resistance, since degradative activity contained in these glycoproteins (β -1,3 y β -1,4-glucanase and chitinase) can hydrolyze cell wall of many teliospores at the same time.

2. It has been confirmed that arginase contained in HMMG fraction (SCA) is responsible for agglutination and it also inhibits teliospore germination. The chemoattractant agent, other than fungal arginase, has not yet been characterized.

3. Composition of fungal proteins (FP) segregated during germination in very similar to HMMG composition and also stimulate chemoattraction and cytoagglutination of teliospores. However, FP promote germination of cells. Thus, FP are considering a *quorum sensing* signal while HMMG are considering a false *quorum sensing* signal.

4. Fungal arginase and sugarcane arginase compete for the same wall ligand present on teliospores surface, by which the fungal enzyme has more affinity. That is why resistance to infection could be linked to a constitutive production of active arginase by the plant. It could bind to its wall ligand before fungal arginase was produced in the early stages of germination.

5. *S. scitamineum* teliospores have an organized cytoskeleton involved in important processes, such as germination and movement. Actin polymerization is necessary for germ tube elongation and microtubules appear to be critical for nucleus translocation during germination. On the other hand, the invaginations observed during the cellular displacement indicate that movement occurs by means of continuous episodes of polymerization and depolymerization of the actin cytoskeleton, in collaboration with the myosin, and not due to the existence of external motile structures. In turn, actin and microtubules interact, participating together in the establishment of cellular polarity.

6. HMMG glycoproteins stimulate the organization of the actin cytoskeleton to induce the movement of the teliospores towards the cytoagglutination points, but disorganize it to avoid its germination, causing agglutinated cells to lose their polarization.

7. Germination blockage occurs as a consequence of an increased production of polyamines by arginase. Then, microtubule depolymerization by the excess of polyamines blocks the migration of the nucleus towards the germinative pore, so that its translocation to the emerging hyphae does not take place and germination fails.

8. The absence of constitutive production of active arginase from the plants of cv. B 42231 could be responsible for the susceptibility of these plants to infection by not triggering effectively some of the early mechanisms of defense that confer resistance, such as cytoagglutination or increased concentration of polyamines that blocks the germination of teliospores.

9. A decrease of arginase activity levels in HMMG produced by My 55-14 cv. after infection could reflect a modification in the defensive strategy of the plants, which would try to promote a more specific response to the presence of the pathogen.

10. Response of the resistant cv. to infection is related to a decrease in the expression levels of the genes coding for dirigent proteins. This decrease leads to an increase in the production of lignans pinoresinol and secoisolariciresinol, which appear to play a relevant role in the inhibition of colony growth and teliospore germination, respectively.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es uno de los cultivos comerciales más destacados en países tropicales y sub-tropicales, y supone para el mundo la principal fuente de azúcar blanco (Sundar *et al.*, 2015). Por otro lado, la enfermedad del carbón es una de las infecciones más importantes causadas por el hongo filamentoso *Sporisorium scitamineum* (Sydow, 1924) sobre la caña de azúcar. Esta enfermedad se caracteriza porque el patógeno, desarrolla, durante su crecimiento, un micelio dicariótico intracelular que deriva de la conjugación de esporidios compatibles e invade la planta completamente (Waller, 1970). La entrada del micelio infectivo en el meristemo de la yema vegetativa ocurre en un periodo comprendido entre 6 y 36 horas después de que las teliosporas hayan sido depositadas sobre las escamas de las yemas (Alexander y Ramakrishnan, 1980).

Debido a que el patógeno puede usar los estomas abiertos y otras aberturas del hospedador como vía de entrada para penetrar en los tejidos internos, cabe pensar que las teliosporas depositadas al azar en la superficie de la hoja deben desarrollar mecanismos de desplazamiento hacia las vías de entrada a la planta, como ha sido sugerido por Santiago *et al.* (2012). Brand y Gow (2012) resumen el

conocimiento actual en relación al movimiento de las esporas durante la interacción planta-patógeno. Los dos mecanismos sugeridos más frecuentemente son las contracciones submicroscópicas de fibrillas distribuidas helicoidalmente en las paredes celulares y la existencia de apéndices móviles en zoosporas. Otras especies de hongos patógenos producen esporas que son capaces de desplazarse mediante un movimiento denominado *gliding* o deslizamiento. Este tipo de movimiento difiere del arrastre o la natación en que el deslizamiento no conlleva la acción de ningún órgano de motilidad externo aparente ni ningún cambio evidente en el tamaño celular, y además, requiere siempre de la presencia de un sustrato.

Uno de los cambios más evidentes que debe ocurrir durante la germinación de las teliosporas es el establecimiento de polaridad celular (Fontaniella *et al.*, 2002). Las hifas de los hongos filamentosos son células extremadamente polarizadas, donde el continuo movimiento de vesículas desde el citoplasma de la teliospora hacia la hifa en formación es esencial para el desarrollo del organismo (Fischer *et al.*, 2008; Baumann *et al.*, 2012). Por esta razón, el citoesqueleto en las células fúngicas desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del crecimiento polarizado. De forma general, los MT están implicados en la división nuclear y en el transporte a

larga distancia de componentes celulares necesarios para el crecimiento del organismo, mientras que los filamentos de actina parecen ser requeridos para la orientación en la célula de eventos más localizados (Xiang y Plamanny, 2003). Además, alteraciones en la dinámica de los MT conllevan modificaciones en la forma y talla del núcleo. Esto está a menudo relacionado con la diferenciación celular pero también con daño celular (Wilson & Jordan, 1995; Mollinedo y Gajate, 2003; Salinas *et al.*, 2014; Briceño *et al.*, 2015) y enfermedad (Jevtić *et al.*, 2014) mientras que la fragmentación nuclear está relacionada generalmente con muerte celular (Farage-Barhom *et al.*, 2011; Domínguez y Cejudo, 2015).

La resistencia a la enfermedad del carbón por parte de la caña de azúcar parece ser el resultado de un proceso multifactorial en el cual se ha observado la acumulación de diversos componentes como fitoalexinas (componentes antimicrobianos que se acumulan en el sitio de infección), enzimas degradativas (como quitinasas, β -1,3-glucanasas y proteasas), enzimas sistémicas que estimulan la producción de componentes defensivos antimicrobianos y biopolímeros de protección (como peroxidasas y fenol oxidasas), biopolímeros que restringen la velocidad de actuación de los patógenos (como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, la lignina o la calosa)

y algunos agentes inductores y/o reguladores de la actividad de numerosas moléculas implicadas en la respuesta de defensa (como elicitores de origen vegetal o microbiano) (Kuc, 1990).

Plantas de caña de azúcar resistentes a la enfermedad producen glicoproteína de defensa que acumulan en las células parenquimatosas de los tallos. Estas glicoproteínas, que han sido definidas como macromoléculas de mediano y alto peso molecular (MMMG, *Mid-Molecular Mass Glycoproteins* y HMMG, *High-Molecular Mass Glycoproteins*), inducen adhesión homotípica e inhiben la germinación de las teliosporas de *Sporisorium scitamineum* (Fontaniella *et al.*, 2002; Millanes *et al.*, 2005b). El efecto que estas glicoproteínas causan sobre la germinación podría estar relacionado con la inhibición de la emergencia del tubo germinativo como resultado de la disrupción del citoesqueleto y la agregación celular (Fontaniella *et al.*, 2002) por la arginasa contenida en la fracción HMMG. La actividad arginasa, que cataliza la producción de ornitina a partir de L-arginina, se relaciona directamente con la síntesis de poliaminas (Walters, 1995).

Muchas investigaciones previas han destacado la correlación entre la patogenicidad fúngica y la acumulación de PAs (Rajam *et al.*, 1985; West y Walters, 1989). Por otro lado, en plantas las PAs

están implicadas en importantes procesos fisiológicos (Gill y Tuteja, 2010) y participan en el desarrollo de la tolerancia ante diferentes formas de estrés abiótico (Gupta *et al.*, 2013; Gill y Tuteja, 2010) y biótico. El papel defensivo de las poliaminas podría ser consecuencia de su unión a algunas moléculas dentro de las células, siendo capaces de bloquear importantes procesos durante el desarrollo del patógeno. Esto es posible debido a su naturaleza policatiónica a pH fisiológico. Las poliaminas son capaces de unirse fuertemente a cargas negativas presentes en diferentes componentes celulares, como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Gupta *et al.*, 2013).

En las plantas existen otros importantes mecanismos defensivos. Por ejemplo, la lignificación incrementa en los organismos vegetales como consecuencia de una situación de estrés. La producción de lignina y lignanos es desencadenada a partir de los p-cumaril, coniferil y sinapil alcoholes. Estos alcoholes son dirigidos hacia rutas específicas de biosíntesis (Lewis & Yamamoto, 1990; Lewis & Davin, 1999; Lewis *et al.*, 1999). La producción de dímeros y trímeros a partir de los monolignoles requieren la actividad de las proteínas dirigentes (DIR), una familia de proteínas, exclusiva de plantas relacionadas con la producción de ligninas y con la defensa ante la invasión de patógenos y diferentes

formas e estrés abiótico. Estas proteínas son responsables del acoplamiento estéreo-selectivo de los monolignoles para producir lignanos o lignina. Estas últimas son componentes estructurales de la pared celular, mientras que los lignanos son moléculas implicadas en procesos defensivos en plantas (Davin y Lewis, 2000).

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el estudio de los mecanismos tempranos de defensa de la caña de azúcar contra la enfermedad del carbón que son desencadenados por las glicoproteínas HMMG y que comprometen la reorganización del citoesqueleto en las teliosporas de *Sporisorium scitamineum*. En base a este objetivo principal se proponen una serie de objetivos parciales, enumerados a continuación:

1. Analizar el efecto quimioattractante y citoaglutinante de las glicoproteínas HMMG procedentes del jugo de caña de azúcar sobre las teliosporas de *Sporisorium scitamineum*. Relacionar estos efectos con la capacidad defensiva de las plantas.
2. Investigar las diferentes actividades enzimáticas presentes en el conjunto de glicoproteínas del cv. resistente, responsables de la respuesta de resistencia.

3. Analizar la composición de la fracción de proteínas fúngicas producidas por las teliosporas de *S. scitamineum* durante las primeras etapas de la germinación.

4. Comparar la composición de las HMMG procedentes de la caña de azúcar del cv. resistente con la de la fracción de proteínas fúngicas producidas durante la germinación de las teliosporas del carbón.

5. Investigar la organización del citoesqueleto durante el movimiento y la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* y el efecto que las HMMG causan sobre esta organización.

6. Analizar el papel que las proteínas dirigentes y la producción y acumulación de lignanos desempeñan en la respuesta de defensa temprana de la caña de azúcar a la infección por *S. scitamineum*.

RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos se propone que al menos tres glicoproteínas existen contenidas en el total HMMG del cv. My 55-14: a) una proteína quimioattractante, no caracterizada, b) una arginasa citoaglutinante que inhibe la germinación de las teliosporas y c) al menos tres enzimas con actividad degradativa, β -1,3 y β -1,4-glucanasas y quitinasa. Los procesos de quimiotaxis y aglutinación de las teliosporas forman parte de un

mecanismo de defensa desencadenado por las glicoproteínas HMMG. La citoaglutinación atraparía a un gran número de teliosporas en una pequeña región de contacto con las HMMG, facilitando la acción de las enzimas degradativas contenidas en las HMMG sobre la pared de las teliosporas aglutinadas.

Sorprendentemente, las teliosporas de *S. scitamineum* también segregan su propia arginasa durante la germinación. Sin embargo, la arginasa fúngica activa una cascada de transducción que acelera la germinación de las teliosporas cuando se une a su ligando de pared en la superficie de las células fúngicas. Así, una estimulación de la aglutinación de las teliosporas por parte de las HMMG, las cuales no desencadenan la germinación, resultaría en una señal de falso quórum que evitaría la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum*.

Una organización polarizada del citoesqueleto es necesaria durante el movimiento y la germinación de las teliosporas del carbón. La arginasa producida por cvs. resistentes a la enfermedad del carbón evita la germinación de las células por medio de un incremento en los niveles de poliaminas en las teliosporas. Las poliaminas interaccionan con el citoesqueleto y provocan descondensación nuclear y daño celular. Es interesante que los niveles de poliaminas no incrementan en

las teliosporas tras el contacto con las HMMG producidas por plantas del cv. susceptible (Barbados 42231), lo cual debe estar necesariamente relacionado con su incapacidad para defenderse contra la enfermedad.

Arginasa activa es producida por constitutivamente por plantas del cv. resistente, mientras que no es detectada en el jugo del cv. susceptible. Esto explicaría por qué la despolarización de los microtúbulos, la desorganización nuclear y la inhibición de la germinación no ocurren significativamente en teliosporas incubadas en HMMG de plantas no resistentes.

Por otro lado, las plantas de cvs. resistentes activan mecanismos de defensa específicos tras la infección que conllevan la síntesis de lignanos. Constitutivamente, los tejidos de las plantas del cv. My 55-14 de caña de azúcar poseen niveles más altos de transcritos de proteínas dirigentes (SofDir) que el cv. susceptible (B 42231). La inoculación con esporidios estimula una respuesta diferencial en relación a la expresión de SofDir dependiendo del cv. analizado. Así, se observa una disminución en la expresión de SofDir en My 55-14 y un incremento de su expresión en B 42231. La ausencia de DIR en las plantas resistentes tras la infección deriva en la producción de lignanos con actividad citotóxica.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral son enumeradas a continuación:

1. Las plantas de caña de azúcar del cv. My 55-14, resistentes a la enfermedad del carbón, producen glicoproteínas de defensa (HMMG) contra el patógeno *Sporisorium scitamineum* que desencadenan la quimioatracción y la citoaglutinación de las teliosporas. La agregación de un gran número de células fúngicas en una pequeña zona de contacto con las glicoproteínas confiere resistencia, ya que la actividad degradativa contenida en el conjunto de estas glicoproteínas (β -1,3 y β -1,4-glucanasa y quitinasa) puede actuar hidrolizando las paredes de muchas teliosporas simultáneamente.
2. La proteína arginasa (SCA), contenida en la fracción glicoproteica HMMG y semi-purificada del cv. My 55-14 en conformación activa, es el agente citoaglutinante, el cual además inhibe la germinación de las células fúngicas. El agente quimioattractante, distinto de la arginasa fúngica, aún no ha sido caracterizado.
3. Las teliosporas producen durante su germinación un conjunto de proteínas (FP) de composición muy similar a la fracción glicoproteica HMMG de las plantas del cv. My 55-14. Estas proteínas también

estimulan la quimioatracción y la citoaglutinación de las teliosporas, pero, contrariamente a HMMG, aceleran su germinación por acción de la arginasa fúngica activa (AFA). Así, las proteínas segregadas por las teliosporas son consideradas una señal de quórum, mientras que las glicoproteínas de defensa constituirían una señal de falso quórum al bloquear el desarrollo del patógeno.

4. La arginasa fúngica (AFA) y la arginasa de la caña de azúcar (SCA) compiten por el mismo ligando de pared presente en la superficie de las teliosporas, por el cual la enzima del hongo tiene más afinidad. Por ello, la resistencia a la infección podría estar ligada a una producción constitutiva de arginasa activa por parte de la planta, de manera que ésta pudiera unirse a su ligando de pared antes de que la arginasa fúngica fuera producida en las primeras etapas de la germinación.

5. Las teliosporas de *S. scitamineum* poseen un citoesqueleto organizado implicado en importantes procesos, como son la germinación y el movimiento. La polimerización de la actina es necesaria para la elongación del tubo germinativo y los microtúbulos parecen ser fundamentales para la translocación del núcleo durante la germinación. Por otro lado, las invaginaciones observadas durante el desplazamiento celular indican que éste

tiene lugar por medio de continuos episodios de polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, en colaboración con la miosina, y no debido a la existencia de estructuras motiles externas. A su vez, la actina y los microtúbulos interaccionan, participando conjuntamente en el establecimiento de la polaridad celular.

6. Las glicoproteínas HMMG de caña de azúcar del cv. My 55-14 estimulan la organización del citoesqueleto de actina para inducir el movimiento de las teliosporas hacia los puntos de citoaglutinación, pero lo desorganizan para evitar su germinación, haciendo que las células aglutinadas pierdan su polarización.

7. El bloqueo de la germinación se debe a una producción incrementada de poliaminas por acción de la actividad arginasa. Una despolimerización de los microtúbulos por un exceso de poliaminas bloquea la migración del núcleo hacia el poro germinativo, de manera que su translocación hacia la hifa emergente no tiene lugar y la germinación del patógeno falla.

8. La ausencia de producción constitutiva de arginasa activa por parte de las plantas de caña de azúcar del cv. B 42231 podría ser responsable de la susceptibilidad de estas plantas a la infección al no desencadenarse eficazmente algunos de los mecanismos tempranos de defensa que confieren resistencia, como son la

citoaglutinación o el incremento de la concentración de poliaminas que bloquea la germinación de las teliosporas.

9. La disminución en los niveles de actividad arginasa en las glicoproteínas HMMG de caña de azúcar producidas por el cv. My 55-14 tras la infección podría reflejar una modificación en la estrategia defensiva de las plantas, las cuales tratarían de promover una respuesta más específica ante la presencia del patógeno.

10. La respuesta del cv. resistente, My 55-14, a la infección, consiste en una disminución de los niveles de expresión de los genes que codifican para proteínas dirigentes. Dicha disminución viene acompañada de un incremento en la producción de los lignanos pinoresinol y secoisolariciresinol, los cuales parecen desempeñar un papel relevante en la inhibición del crecimiento de las colonias y la germinación de las teliosporas, respectivamente.

Introducción

1-LA ENFERMEDAD DEL CARBÓN

La enfermedad del carbón es causada en la caña de azúcar por el hongo filamentoso *Sporisorium scitamineum* (Sydow, 1924). El cultivo comercial de caña de azúcar es uno de los más destacados en países tropicales y sub-tropicales, donde la infección ocasiona considerables pérdidas sobre los cultivos y una significativa reducción de la calidad de su jugo (Ferreira y Comstock, 1989). Numerosos estudios encaminados a desentrañar las bases de la interacción planta-patógeno son realizados con el fin de limitar las pérdidas naturales y económicas derivadas de la enfermedad.

1.1-LA PLANTA: *Saccharum officinarum*

1.1.1-Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar se muestra en la Tabla I. Dentro de la gran familia de las gramíneas (*Poaceae*), el género *Saccharum* comprende seis especies caracterizadas por presentar distinto grado de poliploidía; dos de ellas silvestres (*S. robustum* y *S. spontaneum*) y cuatro de ellas cultivadas (*S. sinense*, *S. barberi*, *S. edule*, *S. officinarum*). En concreto, *S. officinarum* tiene como ancestros a *S. spontaneum*, *Miscanthus sinensis* y *Erianthus arundinaceus* (Daniels y Roach, 1987). Las variedades comerciales cultivadas actualmente son híbridos, complejos, de dos

o más especies (Julien *et al.*, 2012). Así, existe un gran número de cultivares (cvs.) comerciales originados por hibridaciones interespecíficas mediante procesos de mejora genética. Es el caso de *S. officinarum* y *S. spontaneum*, donde el híbrido formado mantiene el eficiente nivel de productividad de la primera especie y la elevada resistencia ante enfermedades de la segunda (Cox *et al.*, 2000).

Tabla I

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i> (monocotiledónea)
Subclase	<i>Commelinidae</i>
Orden	<i>Poales</i> Small.
Familia	<i>Poaceae</i>
Subfamilia	<i>Panicoideae</i>
Tribu	<i>Andropogoneae</i>
Subtribu	<i>Saccharinae</i>

Tabla I. Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Gabriel y Galán, 2002).

1.1.2-Morfología básica de la planta

Morfológicamente, la caña de azúcar es una gramínea tropical perenne caracterizada por la presencia de dos tipos de tallos: el subterráneo o rizoma y el aéreo, utilizado para la extracción del jugo. La función principal del tallo subterráneo o rizoma es la de absorber agua y sales minerales, proporcionar anclaje y almacenar materiales de reserva (Subirós, 1995).

El tallo aéreo de la caña de azúcar, cilíndrico, está compuesto por una serie de nudos y entrenudos. El nudo, la porción más dura y fibrosa del tallo, contiene las yemas y el anillo de crecimiento. El entrenudo es la porción del tallo localizada entre dos nudos y sus características difieren en función de la variedad de caña de azúcar. El tallo es un órgano muy importante en planta, debido a que en el parénquima del entrenudo se almacena la sacarosa (Daniels y Roach, 1987). Una acumulación rápida de sacarosa en los tejidos de almacenamiento se relaciona con un alto nivel de madurez en las plantas de caña de azúcar (Julien *et al.*, 2012).

La hoja está formada por dos partes: la vaina foliar y la lámina foliar. La unión entre estas dos partes se denomina lígula, la cual posee un importante valor diagnóstico en la clasificación de clones y variedades de caña (Artschwager, 1951). La vaina foliar es tubular, envuelve al tallo y es ancha en la base. La lámina foliar, al igual que la vaina, es pubescente en la cara abaxial y glabra en la adaxial o superior (Moore, 1987). Esta lámina foliar presenta una anatomía clásica de una planta C4 o anatomía Kranz. Como planta C4, el primer producto de fijación fotosintética del CO₂ en la caña de azúcar es un intermediario de cuatro átomos de carbono, y no de tres, como ocurre en las plantas C3 (Edwards y Huber, 1981), siendo la caña de azúcar una

de las plantas más eficientes en la producción de carbohidratos mediante la fotosíntesis (Ledon y Gonzales, 1950).

El haz vascular de la caña de azúcar incluye xilema, floema y fibras. Estas fibras consisten en esclereidas exteriores que rodean al haz vascular y un anillo interno de células que envuelven al floema. Algunas esclereidas sirven de acoplamiento entre las capas internas y externas, y un conjunto compacto de esclereidas ocupa el volumen interno total del borde de la hoja. Ninguna de estas esclereidas están lignificadas, mientras que sí lo están las esclereidas que rodean al haz vascular y las que se encuentran en el borde externo de la hoja (Legaz *et al.*, 2006).

La morfología de la planta es importante para la caracterización correcta de las diferentes variedades de caña de azúcar (Rodríguez y González, 1984), las cuales también se diferencian en el umbral de resistencia al patógeno *S. scitamineum*. Durante años, el cultivo de variedades resistentes así como el estudio de las características que dan lugar a esa resistencia son materia prioritaria. Sin embargo, a menudo el incremento de la resistencia a la enfermedad del carbón se ha complicada por el surgimiento de nuevas variedades patogénicas (Sundar *et al.*, 2012).

1.2-EL PATÓGENO:

Sporisorium scitamineum

1.2.1.Clasificación taxonómica

Sporisorium scitamineum (Syd), previamente conocido como *Ustilago scitaminea*, es un basidiomiceto causante de la enfermedad del carbón en las plantas de caña de azúcar, siendo el agente fitopatógeno que más afecta a la óptima producción de los cultivos. Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla II.

Tabla II

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Basidiomycota</i>
Clase	<i>Ustilaginomycetes</i>
Orden	<i>Ustilaginales</i>
Género	<i>Sporisorium</i>
Especie	<i>Sporisorium scitamineum</i> (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll y Oberw. 2002
Sinónimos	<i>Ustilago scitaminea</i>

Tabla II. Clasificación taxonómica del patógeno *Sporisorium scitamineum*.

Los carbones, como *S. scitamineum*, se denominan así debido a que forman masas de esporas negras y pulverulentas, con aspecto de polvo de carbón (Figura 1). Todos los carbones son patógenos de plantas y se incluyen en el orden *Ustilaginomycetes*. Desde el punto de vista económico son agentes infecciosos muy importantes, ya que provocan graves daños

en una gran variedad de cosechas y plantas ornamentales. Existen unas 1100 especies de carbones (Kahmann *et al.*, 2000) que atacan a angiospermas de más de 75 familias (Duran, 1973), afectando principalmente a miembros de la familia de las gramíneas y de las ciperáceas.

Figura 1



Figura 1. Grupo de esporas de *S. scitamineum* visualizado a través de un microscopio óptico. La barra de escala indica 3 μ m.

1.2.2-El ciclo vital de los *Ustilaginales*

El ciclo vital de los carbones es más simple que el de las royas, pues se desarrolla sobre la misma planta. En la naturaleza, el micelio dicariótico de estos hongos parece ser el causante de su infección (Alexopoulos *et al.*, 1996, Webster, 1989). Así, el micelio primario es saprofítico y de escasa duración, no siendo infeccioso hasta que se transforma en dicariótico mediante un proceso conocido como somatogamia.

Aunque hay variaciones en el ciclo de los *Ustilaginales*, hay algunas características comunes para todo el grupo (Figura 2). El ciclo incluye, en primer lugar, la producción de teliosporas dentro del tejido del hospedador (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). Tras madurar, las teliosporas, reunidas en los soros, sufren la cariogamia, por la cual sus dos núcleos haploides se fusionan para formar uno diploide (Kurihara *et al.*, 1994), a la vez que adquieren una pared gruesa y oscura que forma la masa de polvo negruzco que recuerda al carbón.

Cuando las condiciones son las adecuadas, la germinación de las teliosporas deriva en la formación del promicelio hacia el que se desplaza el núcleo. Éste entonces sufrirá la meiosis, originando cuatro células haploides (esporidios o basidiosporas), las cuales pueden dividirse asexualmente por gemación, originando un número variable de esporidios. Los cuatro esporidios liberados inicialmente, así como las células formadas a partir de la división mitótica de éstos, en ningún caso son patogénicas (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002).

Figura 2

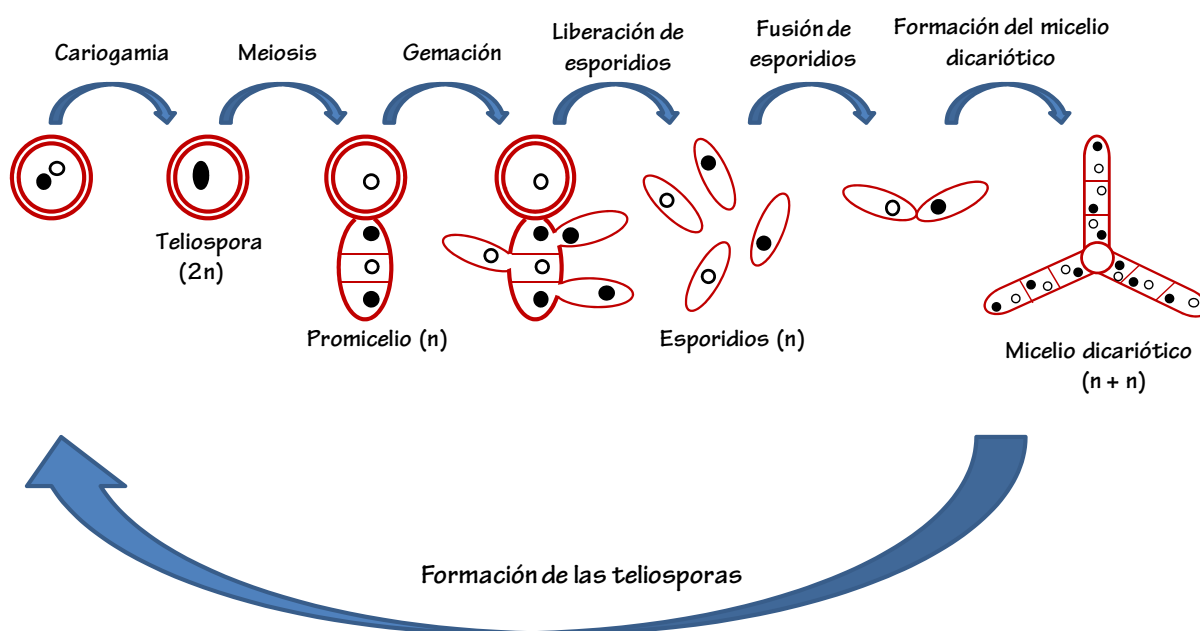


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida del grupo de patógenos *Ustilaginales*.

Sin embargo, la unión de dos de estos esporidios conduce al proceso conocido

como dicariorización. La hifa dicariótica es infecciosa y en la naturaleza es de

parasitismo obligado (Alexopoulos *et al.*, 1996, Webster, 1989). Ésta presenta un crecimiento polarizado desde su extremo, típico de los hongos filamentosos (Snetselaar y Mims, 1992; Banuett y Herskowitz, 1996).

El micelio dicariótico crece intercelularmente invadiendo toda la planta y produciendo las teliosporas o ustilosporas, reunidas en gran número formando los denominados soros. Estas teliosporas o esporas de los carbones son las estructuras características de las *Ustilaginales* y son muy importantes para su clasificación taxonómica. Se forman en masa y pueden desarrollarse en distintos lugares del hospedador, entre los que figuran las flores, las hojas, los tallos, los rizomas y, en algunos casos, las raíces.

Como en el resto de *Ustilaginales*, el micelio diploide y dicariótico de *S. scitamineum* es el que posee capacidad infectiva, ya que logra penetrar en los tejidos del hospedador y dañar los tejidos meristemáticos de la planta (Waller, 1970). Sin embargo, a pesar de la cercanía evidente entre *Sporisorium* sp. y *Ustilago* sp., éstos presentan ciertas diferencias en su modo de infección. *Ustilago* infecta las partes aéreas de la planta formando, rápidamente agallas o tumores llenos de teliosporas, mientras que aquél infecta plántulas jóvenes, puede permanecer

asintomático y progresa sistémicamente (Que *et al.*, 2014a).

1.3-EL PATOSISTEMA Y LA ENFERMEDAD

La enfermedad del carbón, producida por el hongo filamentos *S. scitamineum*, es una de las mayores patologías que afectan a la caña de azúcar provocando importantes pérdidas en los cultivos de *S. officinarum*.

La enfermedad fue primeramente descrita en Sudáfrica, según los datos de Luthra *et al.* (1940), desde donde comenzó a extenderse al resto del mundo. Hasta los años cincuenta, la enfermedad del carbón era motivo de preocupación sólo en Asia y Argentina. A partir de ese momento se extendió por África, donde entonces no existían programas enfocados al desarrollo de la resistencia. En los años 70 y 80 la enfermedad se expandió a Hawái, el Caribe, EEUU y Centroamérica. Estudios epidemiológicos fueron detallados ya por Bergamin *et al.*, en 1989, quienes alertaban de la cantidad de cultivos infectados en Brasil. Desde entonces, la enfermedad del carbón ha sido importante en casi todas las áreas de cultivo de caña de azúcar en el mundo. El aumento de la incidencia de la enfermedad ha sido posteriormente asociado a la susceptibilidad varietal y a un aumento en la edad de los cultivos (Sundar *et al.*, 2012).

S. scitamineum presenta dos estadios diferenciados en su crecimiento: monocariótico (haploide y diploide) y dicariótico (di-haploide) durante su ciclo de vida (Singh *et al.*, 2004). La infección en el hospedador depende de la combinación de dos esporidios haploides y opuestos sexualmente (Trione, 1990; Singh *et al.*, 2004; Izadi y Moosawi-Jorf, 2007).

La enfermedad se caracteriza porque el patógeno desarrolla durante su crecimiento un micelio dicariótico intracelular que deriva de la conjugación de esporidios compatibles e invade la planta completamente (Waller, 1970), siendo las plantas más jóvenes más vulnerables al ataque del patógeno (Bock, 1964; Andreis, 1981; Tokeshi, 2005). Cuando se estimula el crecimiento de micelio dicariótico de *S. scitamineum* en condiciones de laboratorio se observa que éste presenta un crecimiento lento, es blanco y muestra una apariencia algodonosa y mullida (Sundar *et al.*, 2012).

Los síntomas visibles de la enfermedad se basan en la aparición de una estructura reproductora conocida como "látigo" (Figura 3), relacionada con los procesos de esporogénesis y diseminación de las esporas. Esta estructura, que está compuesta por células de la planta y el patógeno, comienza a formarse en el meristemo apical del tallo (Carvalho *et al.* 2016), lo que finalmente implica su

destrucción. Otros síntomas menos comunes son la presencia de agallas en las hojas y en el tallo y la proliferación de brotes (Comstock y Lentini, 2005).

Figura 3



Figura 3. Imagen tomada de Sundar *et al.*, 2012 donde puede observarse la estructura del "látigo", conteniendo una gran masa de esporas.

Los látigos comienzan a aparecer en la caña infectada a los 2-4 meses de edad, aunque el crecimiento máximo se observa al sexto o séptimo mes. Una segunda oleada de aparición de látigos libera una gran cantidad de teliosporas con capacidad infectiva sobre las yemas laterales y terminales. Las esporas contenidas en las yemas infectadas pueden permanecer en estado de latencia y germinar

posteriormente para producir látigos laterales en una tercera oleada, crítica para el establecimiento de la enfermedad (Sundar *et al.*, 2012). Finalmente, las esporas de látigo son dispersadas, llegando a otras plantas donde germinarán si las condiciones son las adecuadas.

La entrada del micelio infectivo en el meristemo de la yema vegetativa ocurre en un periodo comprendido entre 6 y 36 horas después de que las teliosporas hayan sido depositadas sobre las escamas de las yemas (Alexander y Ramakrishnan, 1980). La penetración activa de las hifas fúngicas a partir de estomas abiertos, órganos florales e incluso a través de la cutícula de la epidermis adaxial de la hoja ha sido también observada (Snetelaar y Mims, 1992; White, 1999). La cutícula puede ser destruida mecánicamente a la vez que la hifa progresa hacia la capa mesofilica de las plantas susceptibles a la infección (Santiago *et al.*, 2012b).

El crecimiento posterior de la hifa en el interior de la planta infectada se produce principalmente en las células del parénquima de los internodos inferiores, logrando avanzar en su invasión mediante la rotura de las paredes celulares. Sin embargo, el patógeno también puede permanecer en fase de latencia en el área apoplástica de las células del parénquima (Legaz *et al.*, 2006). De nuevo, la hifa concluye con la formación

del látigo (soro con teliosporas) en los internodos superiores.

Billones de teliosporas (diploides) habrán sido desarrolladas en el látigo como resultado de la cariogamia y la fragmentación de la hifa (Trione 1980, 1990). Bajo las condiciones ambientales adecuadas las teliosporas germinarán, dando lugar a nuevos esporidios compatibles que se fusionarán para dar comienzo a un nuevo ciclo infectivo (Banuett y Herskowitz, 1996).

Debido a que el patógeno puede usar los estomas abiertos y otras aberturas del hospedador como vía de entrada para penetrar en los tejidos internos, cabe pensar que las teliosporas depositadas al azar en la superficie de la hoja deben desarrollar mecanismos de desplazamiento hacia las vías de entrada a la planta. Brand y Gow (2012) resumen el conocimiento actual en relación al movimiento de las esporas durante la interacción planta-patógeno. Los dos mecanismos sugeridos más frecuentemente son las contracciones submicroscópicas de fibrillas distribuidas helicoidalmente en las paredes celulares y la existencia de apéndices móviles en zoosporas. Otras especies de hongos patógenos producen esporas que son capaces de desplazarse mediante un movimiento denominado *gliding* o deslizamiento. Este tipo de movimiento

difiere del arrastre o la natación en que el deslizamiento no conlleva la acción de ningún órgano de motilidad externo aparente ni ningún cambio evidente en el tamaño celular, y además, requiere siempre de la presencia de un sustrato.

2- INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

2.1-GENERALIDADES

La necesidad de comprender por qué ciertos patógenos son capaces de originar una enfermedad en algunas plantas pero no en otras ha tenido intrigados y motivados a los patólogos vegetales durante años (Que *et al.*, 2011). A lo largo de su co-evolución, plantas y patógenos se han visto envueltos en una intrincada relación basada en el constante intercambio de información molecular. Por un lado, los patógenos han perfeccionado multitud de estrategias ofensivas para garantizar su invasión y, por otro lado, las plantas han desarrollado numerosos mecanismos para defenderse de sus ataques (Benhamou, 1996).

Parecen existir sistemas de reconocimiento específicos durante la interacción planta-patógeno. Experimentos presentados por Saavedra *et al.* 2003, demuestran la activación de dichos mecanismo tras el primer contacto de teliosporas de *U. maydis* con la superficie de

tallos, hojas y semillas de plantas de diferentes especies del género *Zea*. La base de dicho reconocimiento debe encontrarse en patrones moleculares, de naturaleza glicoproteica o polisacarídica, repartidos por las superficies de los tejidos.

El reconocimiento gen a gen es una forma muy amplia y difundida de resistencia vegetal a una enfermedad. Implica el reconocimiento de moléculas derivadas del patógeno por parte de proteínas producidas a partir de genes específicos de resistencia (R). Hay muchos patógenos y las plantas tienen multitud de genes R. Las moléculas liberadas por los patógenos son producto de los denominados genes de avirulencia (Glazebrook, 2005), responsables de la existencia del reconocimiento específico (Keen, 1990). Es decir, aquellos patógenos que son reconocidos por el producto de los genes R fallan en su intento de invasión en la planta (Figura 4). Son avirulentos, el hospedador es resistente y la interacción entre ellos es incompatible.

Por el contrario, en ausencia de reconocimiento gen a gen, debido a la carencia de genes de avirulencia en el patógeno y/o debido a la inexistencia de genes R en el hospedador, éste es susceptible al patógeno, que resulta virulento, existiendo entre ellos una interacción compatible (Glazebrook, 2005; Keen, 1990).

Figura 4

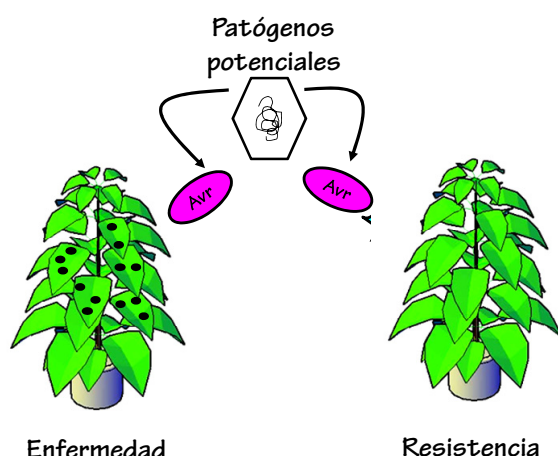


Figura 4. Representación de la compatibilidad/incompatibilidad en la interacción planta-patógeno debida a la presencia/ausencia de genes R de reconocimiento específico ante genes de avirulencia de patógenos potenciales.

Sin embargo, el hecho de que se produzca interacción entre una planta y un patógeno no implica necesariamente el desarrollo de la enfermedad. Esto es así porque, además de un reconocimiento entre ambos organismos, es necesario que las condiciones ambientales sean las adecuadas para ese encuentro, como representa el triángulo mostrado en la Figura 5. Para lograr evitar el avance de una enfermedad, pueden ser dirigidas medidas de control contra cada uno de las tres esquinas del triángulo formado por los tres componentes que interaccionan en el sistema planta-patógeno (Francl, 2001; Escobary Dandekar, 2003).

Figura 5

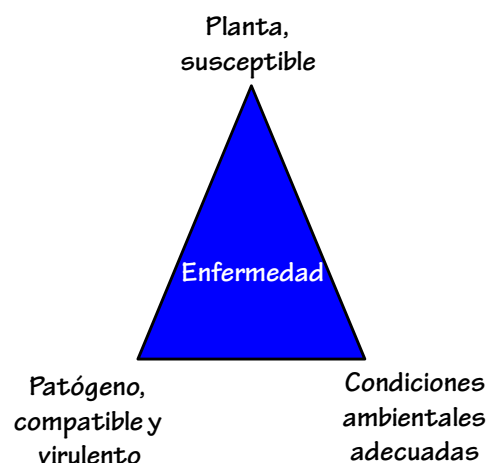


Figura 5. Triángulo que representa los tres elementos que necesariamente deben interaccionar para un establecimiento exitoso de la enfermedad. La planta ha de ser susceptible a la infección, el patógeno compatible y virulento, y las condiciones ambientales las adecuadas para que la infección se desarrolle.

La defensa constitutiva de la planta se desarrolla en ésta antes de la llegada del patógeno. La conforman las barreras estructurales y la defensa bioquímica. Así, en muchas plantas se ha observado que el reforzamiento de las paredes constituye uno de los mecanismos más importantes de resistencia (Carver *et al.*, 1994; Mauch-Mani y Slusarenko, 1996; Mörschbacher *et al.*, 1990).

Por otro lado, la planta debe defenderse por medio de la producción de factores letales capaces de bloquear el crecimiento del agente invasor. Las

moléculas defensivas son producidas en respuesta a la entrada en las células de productos microbianos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns* o patrones moleculares asociados a patógenos), producidos únicamente por el patógeno, el cual estimula la inmunidad innata. Por ejemplo, uno de los PAMPs mejor descritos es la manosa, la cual, tras ser reconocida específicamente por su receptor en las células vegetales (Malinovsky *et al.*, 2014), estimula la estrategia defensiva de la planta.

Por eso, además de la defensa constitutiva (pre-existente) de la planta, existe una defensa inducida por la presencia del patógeno. El reconocimiento de las moléculas derivadas del patógeno por las proteínas R desencadena una señalización que concluye en el aumento de la respuesta defensiva local y sistémica en el tejido de la planta infectada (Campbell y Reece, 2007). Es decir, de la misma manera que el patógeno debe recibir las señales adecuadas de la planta para comenzar el proceso infectivo, diversas moléculas conocidas como elicitores son señales detectadas por la planta que promueven la activación de una respuesta de defensa-bien estructural, bien bioquímica- por parte de ésta. Estos elicitores pueden ser exógenos (moléculas producidas por el patógeno), o endógenos (sustancias químicas liberadas por la planta como resultado de la hidrólisis

de sus paredes celulares) (Dixon *et al.*, 1994).

Así, la resistencia de la planta a una enfermedad puede ser definida como su capacidad para prevenir o restringir el crecimiento y la multiplicación del patógeno por medio de: 1) la percepción de elicitores que informan de la presencia del patógeno, 2) la transducción intracelular de la señal, 3) la síntesis de moléculas defensivas como respuesta y finalmente, 4) el transporte de esas moléculas a sitios estratégicos para lograr la detención del ataque (Dixon *et al.*, 1994).

La resistencia mediada por genes R está normamente ligada a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), requeridas para disparar la muerte celular programada por respuesta hipersensible, la cual limita el acceso del patógeno a agua y nutrientes. También está típicamente asociada con una activación de la señalización por ácido salicílico (SA), la cual conlleva la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que participan en la resistencia. Otras respuestas defensivas están mediadas por mecanismos dependientes de etileno (ET) y/o jasmonato (JA). Estos últimos están de manera general fuertemente vinculados a la protección ante heridas (Glazebrook, 2005).

Por otro lado, los microorganismos también desarrollan mecanismos para lograr la colonización de su hospedador y la evasión de sus defensas. Bacterias fitopatógenas (Galloway *et al.*, 2012) y hongos (Hogan, 2006) han desarrollado una importante estrategia para optimizar su invasión en plantas basada en la producción de moléculas difusibles que informan al resto de individuos del nivel de densidad poblacional (Braunsdorf *et al.*, 2016) en los estadios previos a la infección.

Este comportamiento comunitario, denominado *quorum sensing* o señal de quórum, consiste en la secreción de señales químicas que promueven la atracción de otras células de la población (Figura 6). El fin de este mecanismo es formar un grupo suficiente de individuos que asegure la infección y compense la mortalidad que provocan los mecanismos de defensa de la planta hospedante (Gould y Northcote, 1986). De esta manera, cuanto más grande sea el tamaño del agregado de células patogénicas, mayor será la probabilidad de supervivencia del número mínimo de células que garantiza la invasión.

Figura 6

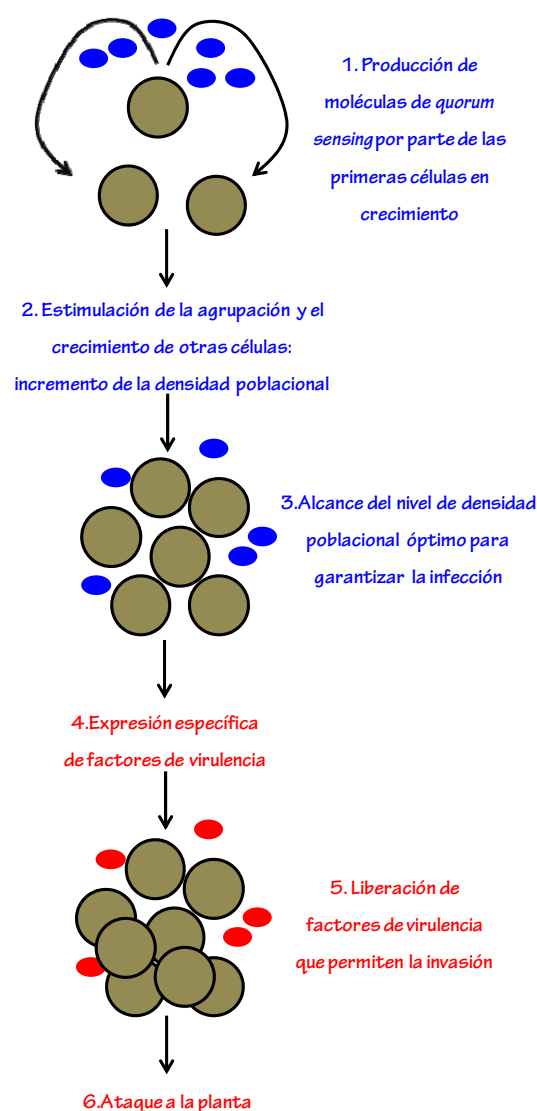


Figura 6. Esquema de la formación del *quorum sensing* durante la interacción planta-patógeno. Las células producen moléculas difusibles que permiten la comunicación célula-célula con otros miembros de la población (1). Esto favorece la agrupación de un gran número de células en el punto de infección y su desarrollo (2). Cuando el nivel de densidad poblacional es el adecuado para una infección exitosa (3), se estimula la expresión de genes específicos de virulencia (4), que permitirán la invasión en la planta (5, 6).

La comunicación intraespecífica es posible mediante la producción y consecuente respuesta a las moléculas de *quorum sensing* (*quorum-sensing molecules*, QSMs) que los patógenos acumulan en el ambiente extracelular (Fuqua *et al.*, 2001; Hogan, 2006) (Figura 6). Estas moléculas de señalización causan variaciones en la regulación de expresión de genes en respuesta a la densidad celular existente (Bassler, 1999; Yajima, 2014) con el fin de promover la invasión únicamente bajo óptimas condiciones. Normalmente, la señal de *quorum sensing* está asociada a la producción de moléculas pequeñas como lactonas, dipéptidos cíclicos y metil-ésteres de ácidos alifáticos. Estas señales, que son continuamente producidas y detectadas por las células, regulan la expresión genética en respuesta a la densidad celular (Yajima, 2014).

2.2-LAS POLIAMINAS (PAs) COMO MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

El paso inicial para la biosíntesis de poliaminas (PAs) es la producción de ornitina por acción de la arginasa (Figura 7). La enzima ornitina descarboxilasa, ODC, actúa sobre la ornitina liberada, incrementando los niveles de putrescina (PUT). Las PAs espermidina (SPD) y espermina (SPM) son sintetizadas por adiciones sucesivas de grupos aminopropil

$[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3-]$ a unidades ya formadas de PUT por acción de las enzimas aminopropiltransferasas espermidina y espermina sintasas, respectivamente (Walters, 1995). La biosíntesis de PAs en bacterias y plantas difiere de la de otros eucariotas por contener una ruta adicional para su producción (Figura 7, ruta indirecta de síntesis). Ésta parte también de la arginina, pero se sirve de la acción de las enzimas arginina descarboxilasa (ADC), agmatina iminohidrolasa y N-carbamoil putrescina amidohidrolasa, todas derivadas de un ancestro cianobacteriano del cloroplasto (Fuell *et al.*, 2010; Walters, 1995). A pesar de que la formación de PUT deriva mayoritariamente de la acción de la ODC, hay evidencias de la actividad ADC en algunos hongos en relación a la síntesis de PUT (Zarby Walters, 1994).

2.2.1-Las PAs en el desarrollo de patógenos fúngicos

Muchas investigaciones previas han destacado la correlación entre la patogenicidad fúngica y la acumulación de PAs (Rajam *et al.*, 1985; West y Walters, 1989). En hongos, las variaciones en las concentraciones de PUT y SPD están asociados a modificaciones morfológicas necesarias para el correcto crecimiento del organismo (Walters, 1995). Por ejemplo, la adición de concentraciones bajas (0,1-1,0 mM) de PUT o SPD a medios de cultivo se

traduce en un incremento del crecimiento de algunos hongos fitopatógenicos, como *Botrytis* sp, *Rhizotonia solani* o *Monilinia fructicola* (Rajam y Galston, 1985), lo que sugiere que las PAs deben desempeñar un papel importante en la regulación del desarrollo fúngico.

La SPD parece ser la poliamina más predominante en hongos (Walters, 1995). De hecho, la función principal de la PUT en *U.*

maydis parece ser la de servir como molécula intermediaria para la biosíntesis de SPD, la cual resulta absolutamente necesaria para el desarrollo fúngico. Sin embargo, si bien la PUT no parece imprescindible para el crecimiento de las células, sí parece implicada en los mecanismos de protección ante diferentes formas de estrés y en el desarrollo de la virulencia de *U. maydis* (Valdés-Santiago *et al.*, 2010).

Figura 7

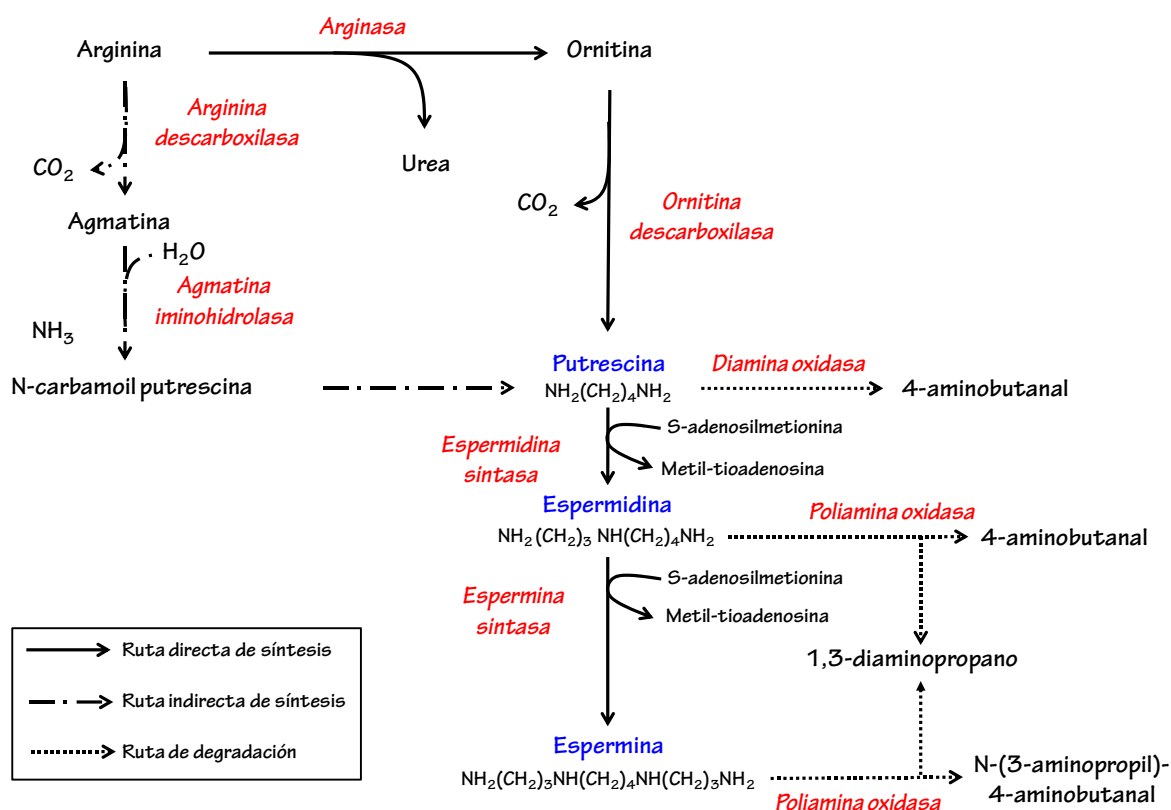


Figura 7. Esquema de la síntesis de PAs en plantas (modificado de Walters, 1995)

Debido a su naturaleza policationica, a pH fisiológico, las PAs son capaces de ligarse fuertemente a cargas negativas existentes en diferentes componentes celulares, como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Gupta *et al.*, 2013a). Por esta razón, son candidatos para unirse a proteínas del citoesqueleto con cargas negativas, como la actina o la tubulina, favoreciendo su polimerización (Grant *et al.*, 1983; Pohjanpelto *et al.*, 1981). En concreto, se ha comprobado que las PAs modulan significativamente el ensamblaje de los microtúbulos (MT) en células eucariotas (Savarin *et al.*, 2010). Esto es debido a que las PAs favorecen el proceso de nucleación e incrementan la atracción entre heterodímeros de tubulina por sus extremos C-terminales, altamente cargados negativamente. Las PAs generan una fuerza de atracción que colabora en el encuentro de las unidades de GTP-tubulina y el filamento en formación (Mechulam *et al.*, 2009), lo cual se traduce en una mayor elongación de este último.

2.2.2-Las PAs como moléculas defensivas en plantas

En plantas, las PAs están implicadas en importantes procesos fisiológicos (Gill y Tuteja, 2010) y participan en el desarrollo de la tolerancia ante diferentes formas de estrés abiótico (Gupta *et al.*, 2013a; Gill y Tuteja, 2010). Las plantas, además, tienen

un amplio repertorio de metabolitos secundarios derivados de las PAs (Fuell *et al.*, 2010). Así, está bien establecido que las PAs son esenciales en el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas pero su papel en la defensa específica contra patógenos aún no es tan conocida (Wojtasik *et al.*, 2015).

La acumulación de PAs en los espacios intercelulares de las hojas de plantas de *Nicotiana tabacum* ha sido observada tras la infección por el virus del mosaico del tabaco (Yamakawa *et al.*, 1998). En concreto, estos autores observaron que la SPM, la cual aumentaba considerablemente tras la infección, tenía un papel predominante como inductora de la síntesis de proteínas de resistencia (PR).

Por otro lado, Wojtasik *et al.*, (2015), observaron un aumento en la expresión de los genes que participan en la síntesis de PAs y un incremento en la cantidad de PAs totales en plantas de lino infectadas por *Fusarium*. Los experimentos *in vitro* demostraron que las PAs actúan inhibiendo el crecimiento de este hongo, lo que sugiere que podrían desempeñar un rol importante en los mecanismos de defensa de las plantas de lino. El incremento de las PAs tras la infección por patógenos fúngicos podría estar relacionado con el papel que éstas desempeñan en la activación de algunas enzimas implicadas en la

degradación de la pared celular, como la pectín metil esterasa (Charnay *et al.*, 1992) durante la interacción planta-patógeno.

2.3-INTERACCIÓN ENTRE *S. officinarum* Y *S. scitamineum*

Algunas especies de carbón, como *U. maydis*, poseen genes codificantes para factores de virulencia que son secretados al medio. Es interesante que el genoma de *S. scitamineum*, recientemente secuenciado (Que *et al.*, 2014b), contenga más *clusters* o grupos genéticos para estos efectores secretados que otras especies similares. Este incremento en el número de genes parece ser debido a la duplicación genética en tándem y a la existencia de otros elementos asociados a estos genes (Dutheil *et al.*, 2016). Entre estos genes, algunos relacionados con la síntesis de enzimas responsables de la degradación de la pared celular están claramente implicados en el desarrollo de la virulencia del patógeno (Que *et al.*, 2014b).

El perfil transcriptómico de *S. scitamineum in vitro* y tras su interacción con plantas de caña de azúcar ha sido analizado por Taniguti *et al.* (2015). Estos estudios revelaron que muchos genes relacionados con la degradación de la pared celular y con la defensa contra la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, ROS

(*Reactive Oxygen Species*), son expresados de manera diferencial en ausencia y en presencia del hospedador. Algunos de los genes han sido identificados, como por ejemplo, los codificantes para las enzimas glucan- β -1,3-glucosidasa, pectin liasa, endo-1,4- β -xilanasas, quitin desacetilasa, α -L-arabinofuranosidasa, y quitinasa.

La producción incrementada de enzimas hidrolíticas durante la interacción planta-patógeno no ocurre solo en el hongo. En las plantas de caña de azúcar también se ha observado un aumento de la expresión de genes codificantes para enzimas degradativas, como la β -1,3-glucanasa, como defensa contra la infección por *S. scitamineum* (Su *et al.*, 2013). Esto refleja la enorme complejidad existente en la interacción entre ambos organismos.

Interesante información proteómica y transcriptómica sobre la comunicación planta-patógeno entre la caña de azúcar y *S. scitamineum* está siendo documentada continuamente, manifestando cómo cambios importantes aparecen durante la infección de las plantas por las células del patógeno en el conjunto de proteínas relacionadas con la defensa, el estrés y el metabolismo (Barnabas *et al.*, 2016).

Han sido llevados a cabo experimentos para valorar la expresión génica diferencial en plantas de caña de azúcar que difieren en el grado de

susceptibilidad a la enfermedad del carbón, a partir de los genotipos Ja60-5 y M31/41, susceptible y resistente, respectivamente, a la infección por *S. scitamineum*. Se observó que la respuesta general implica la expresión de genes relacionados con la producción de ROS y con las rutas defensivas señalizadas por auxinas y etileno en las primeras 72 h tras la inoculación (Lao *et al.*, 2008). Estos autores sugieren un papel principal de la cascada oxidativa y de las rutas de producción de lignina en la defensa temprana de la caña de azúcar a la infección por *S. scitamineum*.

3-MECANISMOS DE DEFENSA DE LA CAÑA DE AZÚCAR ANTE LA INFECCIÓN POR *S. scitamineum*

3.1-UNA DEFENSA MULTIFACTORIAL

La enfermedad del carbón, causada por el hongo *S. scitamineum* es una afección importante para los cultivos de caña de azúcar de todo el mundo. Las enfermedades fúngicas, como el carbón, afectan gravemente al desarrollo de los cultivos y causan abundantes pérdidas económicas que pueden llegar a suponer el 40% de la explotación (China y Rodríguez, 1994). En concreto, la infección por *S. scitamineum* afecta tanto al crecimiento de las plantas

como a la calidad del jugo de la caña de azúcar (Martínez *et al.*, 2000).

La resistencia a la enfermedad del carbón por parte de la caña de azúcar parece ser el resultado de un proceso multifactorial en el cual se ha observado la acumulación de diversos componentes como fitoalexinas (componentes antimicrobianos que se acumulan en el sitio de infección), enzimas degradativas (como quitinasas, β -1,3-glucanasas y proteasas), enzimas sistémicas que estimulan la producción de componentes defensivos antimicrobianos y biopolímeros de protección (como peroxidasas y fenol oxidasas), biopolímeros que restringen la velocidad de actuación de los patógenos (como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, la lignina o la calosa) y algunos agentes inductores y/o reguladores de la actividad de numerosas moléculas implicadas en la respuesta de defensa (como elicitores de origen vegetal o microbiano) (Kuc, 1990).

Se ha propuesto que la resistencia a la enfermedad del carbón depende en gran medida de la capacidad de la planta para evitar la penetración de las esporas, pudiendo estar implicada en la defensa, por ejemplo, la protección ejercida por la cera epicuticular de los tejidos (Dixon, 2001). Por otro lado, el aumento en la lignificación parece ser uno de los principales mecanismos de protección de la caña al

carbón (Legaz *et al.*, 2011). Santiago *et al.* (2012) demostraron que el contenido de lignina se ve incrementado en un 29% en los tallos tras la inoculación en variedades resistentes y sólo en un 13% en plantas susceptibles. La incubación de discos de hoja del cv resistente, Mayarí (My) 55-14, en presencia de factores de virulencia producidos por el hongo *S. scitamineum*, resulta en un incremento del espesor de las paredes celulares lignificadas de las esclereidas y de los elementos xilemáticos, mientras que induce la deslignificación de los mismos tejidos en el cv. susceptible Barbados (B) 42231 (Alarcón *et al.*, 2016).

Otras posibilidades para explicar las bases de la resistencia a la enfermedad son las relacionadas con la producción de agentes defensivos en respuesta a la llegada del patógeno (Lloyd y Pillay, 1980). El desencadenamiento de mecanismos de defensa específicos inducidos por los PAMPs en las primeras fases de la infección sería un proceso similar a lo que ocurre durante la inmunidad innata en animales (Abramovitch *et al.*, 2006).

Los análisis de secuenciación realizados para la identificación de aquellos genes diferencialmente expresados en respuesta a la infección indican variaciones en la expresión de algunos receptores envueltos en la resistencia, de ciertos

factores de transcripción y de enzimas relacionadas con el metabolismo de metil fenilpropanoides (Heinze *et al.*, 2001). Se conoce que la biosíntesis de estos últimos deriva a la producción de una gran variedad de moléculas, como la lignina, los flavonoides y el ácido hidroxicinámico. Además, algunos de estos componentes actúan en plantas, como fitoalexinas, sustancias anti-herbivoría, antioxidantes, protectores contra la radiación ultravioleta, pigmentos o componentes aromáticos (Dixon 2001). También se ha propuesto que la resistencia a la enfermedad está parcialmente determinada por los flavonoides preformados en las yemas (Lloyd y Naidoo, 1983).

De Armas *et al.* (2007) han correlacionado la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad del carbón con cambios en los niveles de algunos componentes fenólicos y en la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasa. Los mecanismos de defensa basados en la modificación tanto en el nivel como en la composición de los fenoles influyen directamente sobre la síntesis de lignina (Benhamou, 2004). La mayor parte de las modificaciones de los fenoles radica en su esterificación por los polisacáridos de la pared celular (de Ascensão y Dubery 2000). Santiago *et al.* (2009) descubrieron que la resistencia del cv. My 55-14 estaba basada en el incremento de

la proporción de ácido cafeico unido a la pared celular y de ácido sirínico en las plantas tras su inoculación, mientras que los niveles de estas moléculas no fueron modificados tras la infección en plantas del cv. susceptible B 42231.

Finalmente, la resistencia a la enfermedad ha sido también relacionada con la acumulación de PAs libres o conjugadas en tejidos de plantas de cultivares de Mayarí 55-14 (Legaz *et al.*, 1998a; Piñón *et al.*, 1999), y con la producción de glicoproteínas en el tallo que inhiben la germinación de las esporas (Legaz *et al.*, 2005; Millanes *et al.*, 2005).

3.2-LA PRODUCCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DE DEFENSA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *S. scitamineum*

Una temprana respuesta de la caña a la infección consiste en la liberación de glicoproteínas, moléculas definidas como macromoléculas de mediano y alto peso molecular, MMMG (*Mid-molecular mass glycoproteins*) y HMMG, (*High-molecular mass glycoproteins*), respectivamente. La cantidad de estas glicoproteínas tras la infección suele incrementarse en las plantas tras la llegada del patógeno.

La mitad glicídica de estas glicoproteínas son heterofructanos compuestos por cadenas de enlaces β -1,2-

fructofuranosidos, capaces de ser hidrolizados por actividad invertasa y unidos a segmentos variables de poligalactitol mediante enlaces éter β -1,2, resistentes a la acción de la invertasa. Se ha descrito que los heterofructanos aislados actúan como agentes cicatrizantes de lesiones mecánicas. Sin embargo, también aparecen como resto glicosídico en las glicoproteínas de defensa producidas en respuesta a lesiones mecánicas o infecciones, desempeñando un papel importante en procesos de reconocimiento de endófitos compatibles (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) o en reacciones de señalización contra patógenos (*S. scitamineum* o *Xanthomonas albilineans*) (Legaz *et al.*, 2011).

De manera general, los cultivares de caña resistentes a la enfermedad producen una cantidad mayor de glicoproteínas de defensa, en comparación con los cultivares susceptibles, y además, la cantidad de estas glicoproteínas puede incrementarse tras la infección con el patógeno (Millanes *et al.*, 2005). Se ha comprobado que la inoculación de plantas de caña de azúcar del cv. Jaronú 60-5 con las teliosporas del patógeno incrementa la producción de glicoproteínas HMMG aunque disminuye las MMMG (Millanes *et al.*, 2008). La concentración de estas glicoproteínas también aumenta tras la inoculación de plantas de My 55-14 donde no se

manifiestan síntomas importantes de la enfermedad debido a su elevada resistencia ante la infección por *S. scitamineum*. Todos estos resultados indican la existencia de una modificación activa por parte de las plantas en relación a la composición del jugo en función de sus necesidades, lo cual debe estar relacionado directamente con su capacidad defensiva.

Estas glicoproteínas, en primer lugar, provocan la citoaglutinación de las teliosporas, lo que dificulta su invasión en la planta (Fontaniella *et al.*, 2002). El efecto citoaglutinante de las glicoproteínas se ve radicalmente disminuido tras el contacto de las células con glicoproteínas previamente tratadas con invertasa, sugiriendo que el enlace β -1,2-fructofuranósido contenido en el total de HMMG debe ser decisivo para la unión a su ligando en la pared de las teliosporas (Millanes *et al.* 2008).

La citoaglutinación de las células fúngicas tras el contacto con las glicoproteínas de la caña debe necesariamente implicar la motilidad de las teliosporas hacia los núcleos de citoaglutinación, probablemente por estimulación de un mecanismo de quimiotaxis hacia el atrayente químico. El mismo proceso debe tener lugar durante el desplazamiento de las teliosporas hacia los sitios de infección a través de la capa de

agua que cubre los brotes y las hojas de la planta (Legaz *et al.*, 2011).

Tras la citoaglutinación las glicoproteínas HMMG y MMMG disminuyen la velocidad de germinación de las células fúngicas, hasta un 50% tras 5 h de contacto con las glicoproteínas producidas por el cv. resistente. Estudios de unión de glicoproteínas marcadas con isotiocianato de fluoresceína o FITC (*fluorescein isothiocyanate*) a la pared de las teliosporas, evidencian que el marcaje de las células se encuentra restringido a la zona de contacto entre células en los agregados. Esto sugiere que la inhibición de la germinación debe estar relacionado con un bloqueo en la emergencia del tubo germinativo como resultado de la disrupción del citoesqueleto y la agregación de las teliosporas (Fontaniella *et al.*, 2002). Experimentos posteriores (Millanes *et al.* 2005) confirmaron que, efectivamente, las glicoproteínas de caña previenen la polarización celular de las teliosporas del carbón y la emergencia del tubo germinativo, mediando sus efectos a través de la unión de receptores específicos en la pared celular de las células fúngicas (Legaz *et al.*, 1995, 1998b).

Lectinas de las plantas *Triticum vulgare*, *Phaseolus lunatus*, *Dolichos biflorus* y de coleoptilos de maíz también ocasionan una inhibición de la germinación de las teliosporas y un bloqueo del desarrollo

fúngico de las células de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995), siendo este efecto similar al producido por las glicoproteínas de plantas de caña de azúcar sobre las teliosporas de *S. scitamineum* (Millanes *et al.*, 2005), patógeno muy cercano filogenéticamente a *U. maydis*.

Las HMMG y MMMG incluyen un conjunto de diferentes glicoproteínas. Entre ellas han sido identificadas diferentes actividades enzimáticas, como son la quitinasa, la arginasa y la actividad hidrolítica (Millanes *et al.*, 2005).

Así, ha sido demostrado que las hojas de caña del cv. My 55-14, resistente a la infección, elicitán β -1,3-glucanasa tras su incubación en presencia de ácido salicílico (SA), de metil-jasmonato o de factores de virulencia extraídos a partir del cv. susceptible B 42231 (Santiago *et al.*, 2008). Estos mismos autores comprobaron además que el SA y los factores de virulencia estimulan la producción de quitinasa en los discos de hoja de las plantas resistentes, mientras que la actividad degradativa disminuye en las plantas susceptibles. Esto sugiere que estas enzimas degradativas podrían desempeñar un papel importante en la resistencia al patógeno fúngico como elementos principales contenidos en las glicoproteínas de defensa (Millanes *et al.*, 2005).

Además, se ha demostrado que las plantas de caña de azúcar como respuesta a la infección por *S. scitamineum* incrementan la producción de PUT (Piñón *et al.*, 1999) la cual, por otro lado impide la polarización requerida para la germinación de las teliosporas a concentraciones superiores a 50 μ M. Las glicoproteínas inhiben entonces el proceso de *capping* (marcaje del polo germinativo de la espora por reestructuración del citoesqueleto), suceso obligado previo a la germinación de las teliosporas (Millanes *et al.*, 2005).

Cuando la arginasa es producida por plantas sanas, ésta se une a la pared de las teliosporas y es completamente desorbida por sacarosa. Sin embargo, únicamente el 50% de la actividad arginasa producida por plantas inoculadas es desorbida por el disacárido (Fontaniella *et al.*, 2002; Millanes *et al.*, 2005) indicando, por un lado que parte de la actividad arginasa desaparece al ser internalizada y reforzando a su vez la idea de que la composición de las glicoproteínas puede ser modificada tras la llegada del patógeno, con el fin de incrementar la especificidad y la eficacia de la respuesta de defensa. Así, se ha sugerido que, aunque parte de la arginasa contenida en el total de glicoproteínas de defensa es retenida en la pared de las teliosporas, otra parte debe ser internalizada por las células fúngicas (Millanes *et al.*, 2008), pudiendo allí catalizar el paso de arginina a ornitina,

molécula que derivará posteriormente en un incremento de PUT (Walters, 1995), como propone la Figura 8.

Figura 8

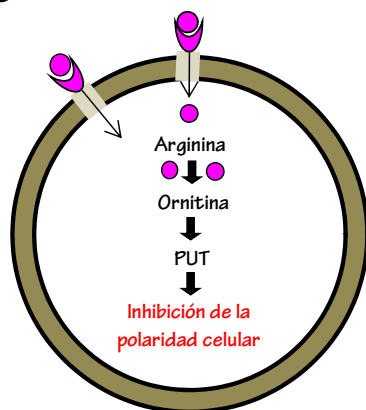


Figura 8. Esquema que representa cómo la arginasa contenida en las glicoproteínas podría ser internalizada en las teliosporas, causando el incremento de PUT responsable de la inhibición del establecimiento de la polaridad celular en las células. Representando (●) la arginasa, (□) un transportador para la arginasa y (◡) el ligando de pared para la enzima.

4-DEFENSA VEGETAL BASADA EN LA PRODUCCIÓN DE LIGNINA Y LIGNANOS

4.1-LA SÍNTESIS DE LIGNINA

La lignina es el segundo producto natural más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Zhong *et al.*, 1998). Es un polímero fenólico, que proporciona a la pared vegetal un soporte estructural adicional, hidrofobicidad y una mayor resistencia ante

la entrada de potenciales patógenos. De hecho, el refuerzo de la barrera física por medio del incremento de la lignificación aparece como respuesta frecuente ante una infección o tras la aparición de heridas (Davin y Lewis, 1992).

4.1.1-Precusores y enzimas involucrados en la síntesis de lignina

El polímero lignina contiene unidades de p-hidroxifenil (H), guayacil (G) y siringil (S), moléculas derivadas, respectivamente, de los monolignoles p-cumaril, coniferil y sinapil alcohol (Zhong *et al.*, 1998), que actúan como precursores (Vanholme *et al.*, 2010)

Las enzimas relacionadas con la biosíntesis de monolignoles son bien conocidas (Bonawitz y Chapple, 2010). La fenilalanina amonio liasa, PAL (*phenylalanine ammonia lyase*), es la enzima de entrada a la ruta metabólica de los fenilpropanoides (Bate *et al.*, 1994), que cataliza la conversión de L-fenilalanina en ácido cinámico. Otras enzimas implicadas en el proceso de producción de precursores de lignina son las enzimas cinamato 4-hidroxilasa, 4-hidroxicinamoil CoA ligasa, cinamoil CoA reductasa, p-cumarato 3-hidroxilasa, ferulato 5-hidroxilasa y OMT, O-metiltransferasa (Boudet *et al.*, 2007). Destaca la actividad de las enzimas cinamil y sinapil alcohol deshidrogenasas (CAD y SAD), enzimas que participan en uno de los

pasos finales de la biosíntesis de monolignoles, catalizando la reducción de los cinamil/sinapil aldehídos a cinamil/sinapil alcoholes antes de la polimerización de la lignina, como representa la Figura 9.

Los estudios de CAD en organismos como *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays*, *Panicum virgatum*, *Oriza sativa*, *Festuca arundinacea* o *Triticum aestivum* por alineamiento de secuencia indican la gran similitud entre estas especies en los dominios conservados y en los característicos residuos de unión de las enzimas alcohol deshidrogenasas (Trabucco *et al.*, 2013). Selman-Housein *et al.* (1999) sugieren que en el genoma de las plantas de caña de azúcar aparecen dos copias genéticas de CAD, una de las cuales codificaría para una sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD). Sin embargo, Bomati y Noel (2005) caracterizaron SAD a partir del árbol de álamo temblón (*Populus tremuloides*), siendo esta enzima la responsable de la reducción del sinapil aldehído a sinapil alcohol. Por otro lado, la enzima CAD contenida en el álamo reduce el coniferil aldehído a coniferil alcohol (Li *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que CAD está funcionalmente relacionada con la reducción del coniferil aldehído, mientras que SAD estaría específicamente vinculada a la reducción del sinapil aldehído en angiospermas.

4.1.2-Formación de lignina

El primer paso en la formación de la lignina es la generación de dos radicales libres a partir de una mezcla de monolignoles por reacciones de oxidación, seguido de su acoplamiento para formar un dímero (Matsushita *et al.*, 2015). Para ello, en primer lugar, los monolignoles formados a partir del ácido cinámico son exportados a través de la membrana plasmática hasta la pared celular secundaria por difusión pasiva, exocitosis o mediante transportadores ABC y/o sistemas de antiporte acoplados al movimiento de protones. Allí, en presencia de Mn^{2+} como cofactor del proceso, son activados enzimáticamente por dos tipos de oxido-reductasas: lacasas dependientes de O_2 y peroxidasas dependientes de H_2O_2 (Sterjiades *et al.*, 1992, 1993; Barros *et al.*, 2015).

Las proteínas dirigentes (DIR) favorecen el acoplamiento estereoespecífico de los monolignoles para formar los dímeros correspondientes (Onnerud *et al.*, 2002). Las unidades activadas por acción de lacasas y peroxidasas y dimerizadas por las proteínas DIR se depositan sobre los extremos del polímero de lignina en formación. El acoplamiento entre dímeros y oligómeros propaga la construcción del polímero de lignina (Matsushita *et al.*, 2015).

Figura 9

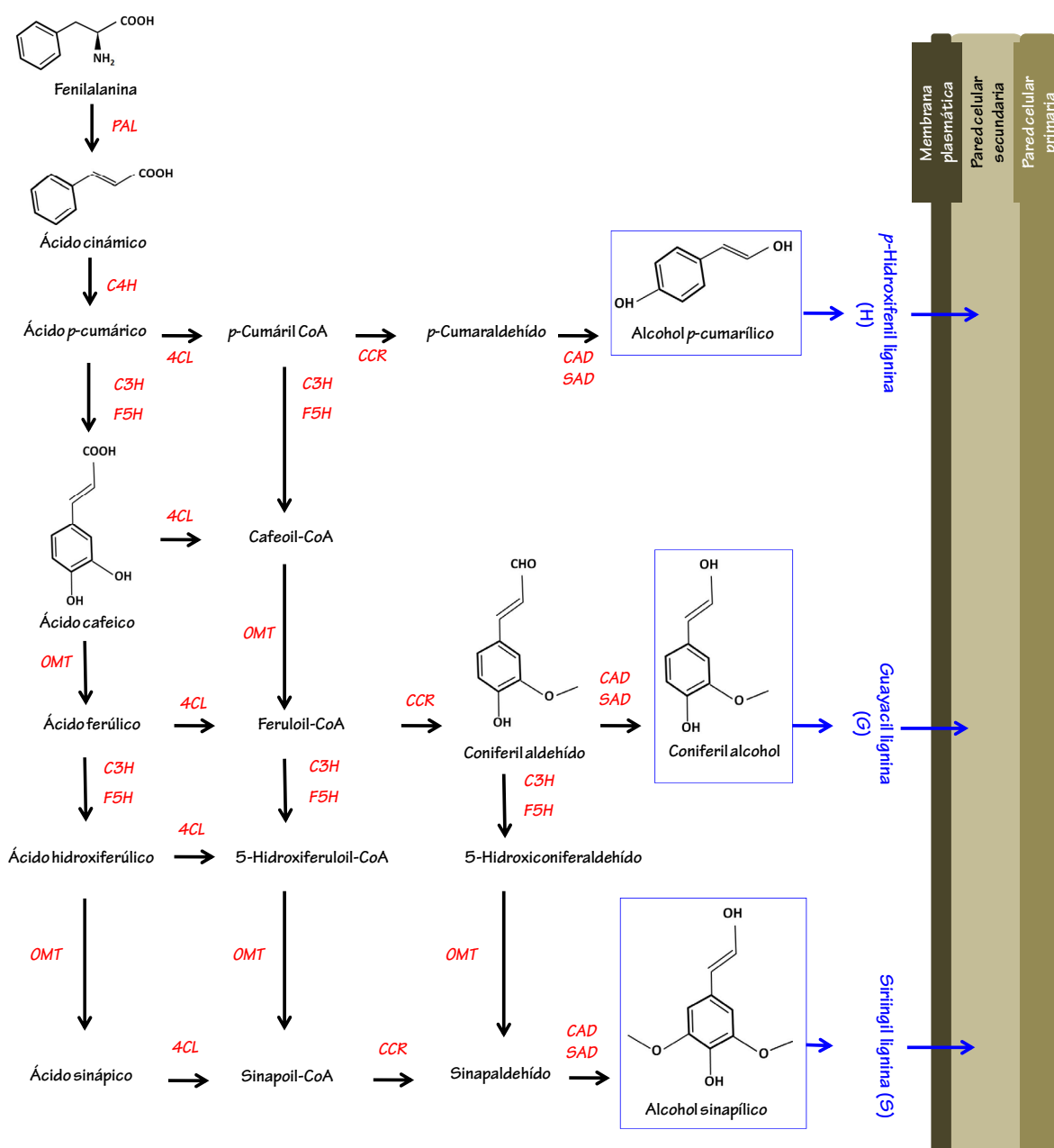


Figura 9. Ruta esquematizada de síntesis de los monolignoles que darán lugar a los tres tipos de lignina en plantas. PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-hidroxicinamoil CoA ligasa; CCR, cinamoil CoA reductasa; CAD, cinamil alcohol deshidrogenasa ; SAD, sinapil alcohol deshidrogenasa ; C3H, *p*-cumarato 3-hidroxilasa; F5H, ferulato 5-hidroxilasa ; OMT, *O*-metiltransferasa. Modificado de Boudet *et al.*, 2007.

A diferencia de lo que ocurre para la formación de grandes polímeros de celulosa, en los que la adición de monómeros es llevada a cabo por la acción de una enzima polimerizante, la adición de monómeros u oligómeros para la formación de lignina tiene lugar en ausencia de actividad enzimática (Sterjiades *et al.*, 1992, 1993; Barros *et al.*, 2015). La abundancia relativa de cada tipo de monolignol contenido en el biopolímero de lignina formado es dependiente de cada organismo vegetal. Por ejemplo, la lignina de dicotiledóneas deriva del coniferil y el sinapil alcohol en su mayor parte, con trazas de p-cumaril alcohol, mientras que la lignina de gimnospermas es principalmente generada a partir del coniferil alcohol, conteniendo una pequeña cantidad de p-cumaril alcohol. La lignina en la hierba está formada por los alcoholes coniferil, sinapil y p-cumaril (Boerjam *et al.*, 2003).

4.2-LAS PROTEÍNAS DIRIGENTES EN LA PRODUCCIÓN DE LIGNINA O LIGNANOS

La producción de dímeros y trímeros a partir de los monolignoles requiere la existencia de las proteínas DIR para guiar el proceso. Se trata de una familia de proteínas, exclusiva de plantas, directamente relacionada con la producción de ligninas y con la respuesta del

vegetal a la invasión por patógenos y al estrés abiótico. Las proteínas DIR son responsables de la estereoselectividad de los radicales derivados de los monolignoles para producir, o bien lignina, o bien lignanos, como refleja la Figura 10.

Se ha observado además, que la actividad de las proteínas DIR tiene lugar en presencia de oxidasas, como lacasas o peroxidasas (David *et al.*, 1997). Estas enzimas generan radicales libres como intermediarios que son capturados por las proteínas DIR. Éstas los orientan adecuadamente para la formación de (+)-pinoresinol (Hazra y Chattopadhyay, 2016).

Sin embargo, la ausencia de proteínas DIR se traduce en el acoplamiento de dos radicales del monolignol "al azar", dando lugar a dímeros como el (±)-dihidroconiferil alcohol, el (±)-pinoresinol o el (±)-guaiacilglicerol (Hazra y Chattopadhyay, 2016). En presencia de proteínas DIR, cada molécula de coniferil alcohol debe unirse a un sitio del dímero enzimático con una alta especificidad, conllevando la producción incrementada de (+)-pinoresinol y evitando la síntesis del isómero negativo (Figura 10).

Figura 10

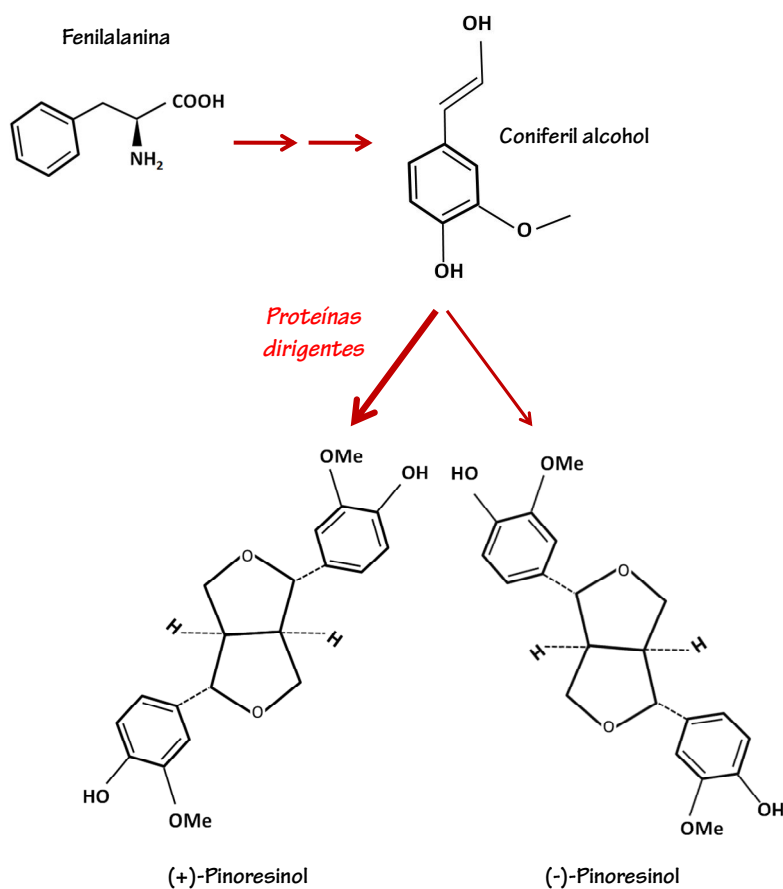


Figura 10. Representación esquematizada de la hipótesis de producción de lignanos por disminución de las actividad de las proteínas DIR, envueltas en la estereoselectividad del pinoresinol.

4.3-PRODUCCIÓN DE LIGNANOS COMO MECANISMO DE DEFENSA VEGETAL

Se ha demostrado que las plantas de *Linum album* acumulan metabolitos secundarios de defensa- lignanos y compuestos fenólicos como los ácidos cinámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico o salicílico- derivados todos ellos de la ruta de los fenilpropanoides (Tashackori *et al.*, 2016). Los lignanos y los

neolignanos son un gran grupo de moléculas caracterizadas por su formación a partir del acoplamiento oxidativo de dos unidades fenólicas C₆C₃. De acuerdo con la nomenclatura IUPAC, los lignanos son dímeros de coniferil alcohol u otro alcohol derivado del ácido cinámico, enlazados por su C₈, según ilustra la Figura 11. Cuando el enlace se produce por un lugar diferente al

C_8 , el dímero correspondiente se denomina entonces neolignano (Moss, 2000).

Figura 11

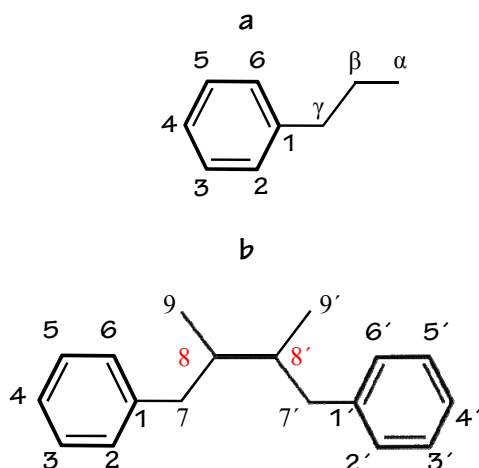


Figura 11. Figura modificada de Moss, 2000.

a) Unidad C_6C_3 que dará lugar al lignano, al dimerizarse. b) Formación del enlace 8-8' que da lugar al lignano.

Posteriormente, ciclaciones y otras modificaciones de los lignanos dan lugar a una gran diversidad en este grupo de compuestos (Fuss, 2003), los cuales varían enormemente en su estructura química, en su grado de oxidación o en los sustituyentes que contienen. A esto hay que sumarle la diversidad enantiomérica del grupo o las variaciones debidas a su distribución filogenética (Umezawa, 2003).

Los lignanos son compuestos producidos por numerosas familias de plantas, ampliamente distribuidos entre angiospermas y gimnospermas (MacRae, y Towers, 1984). Por ello, se encuentran

comúnmente en muchos alimentos y bebidas cotidianas, como las verduras, las semillas, el té, el café o el vino. Los lignanos poseen propiedades antivirales, antioxidantes y anticancerígenas (Tashackori *et al.*, 2016; Kulik *et al.*, 2014, Hazra y Chattopadhyay, 2016) y su toxicidad sobre hongos, insectos y vertebrados ha sido largamente demostrada (MacRae, y Towers, 1984). Actualmente, se cree que una dieta rica en lignanos podría ser beneficiosa y saludable, aunque el efecto específico de estos compuestos sobre el organismo debe ser analizado más ampliamente (Yoder *et al.*, 2014).

Muchos elicitores producidos por organismos patogénicos incrementan la síntesis de lignanos y otros compuestos defensivos en plantas (Tashackori *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha comprobado el efecto potenciador que los compuestos elicitados por el micelio de *Piriformospora indica* tienen sobre la producción de lignanos en plantas de *Linum album*. Este aumento se correlaciona a su vez con el incremento en la actividad de la enzima PAL y con el contenido de ácidos fenólicos (Tashackori *et al.*, 2016). Por otro lado, lignanos aislados de semillas de plantas de *Myristica fragrans* poseen evidente actividad antifúngica ya que son capaces de inhibir *in vivo* el desarrollo de enfermedades como el tizón del arroz, la roya de la hoja en el trigo, el moho pulverulento de la cebada o el tizón

tardío de tomate (Cho *et al.* 2007), alteraciones causadas por los hongos *Pyricularia grisea*, *Puccinia recondita*, *Erysiphe graminis* y *Phytophthora infestans*, respectivamente.

Kulik *et al.* (2014) analizaron el efecto del pinoresinol y secoisolariciresinol, dos lignanos que se acumulan significativamente en los granos de trigo, sobre el crecimiento de cinco cepas de *Fusarium graminearum*. Estos autores observaron que ambos compuestos ejercían un efecto negativo sobre el desarrollo del patógeno, disminuyendo la liberación de toxinas por parte del hongo y su crecimiento radial. Windayani *et al.* (2014) han demostrado cómo siete lignanos aislados de las hojas de las plantas de *Phyllanthus myrtifolius* desarrollan actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*. De igual manera, se ha comprobado cómo algunos lignanos producidos por plantas de *Larrea divaricata* dificultan el crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro*, de las células de *Fusarium graminearum* (Vogt *et al.*, 2013), quedando manifiesta la actividad antifúngica de estos compuestos.

4.4-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE LIGNINAS Y LIGNANOS EN PLANTAS

Las ligninas y los lignanos son producidos a partir de todo el conjunto de monolignoles formados a partir de los p-cumaril, coniferil

y sinapil alcoholes. Estos alcoholes son dirigidos hacia rutas específicas de biosíntesis (Lewis y Yamamoto, 1990; Lewis y Davin, 1999; Lewis *et al.*, 1999). Las ligninas son componentes estructurales de la pared celular, mientras que los lignanos son moléculas implicadas en procesos defensivos en plantas (Davin y Lewis, 2000). Wang *et al.* (2013) proponen que los monolignoles pueden estar en estado libre o como glucósidos, como moléculas almacenadas. Estos autores sugieren que el conjunto de monolignoles almacenados podría ser específicamente utilizado bien para producir lignanos (fitoalexinas), como defensa bioquímica, o bien para producir lignina, con el fin de reforzar la barrera estructural e impedir la penetración del patógeno. De esta manera, los procesos de glicosilación/desglicosilación de los monolignoles deben desempeñar un papel determinante en la regulación de los niveles de lignina/lignano en las células. La estereoselectividad posterior de los monolignoles liberados dependerá de la regulación de la síntesis de proteínas DIR, en función de las necesidades del organismo, tal como se pretende esquematizar en la Figura 12.

La formación de (+)-pinoresinol se ve favorecida en presencia de proteínas DIR. Sin embargo, en ausencia de proteínas DIR aumenta la formación de (±)-pinoresinol. Un incremento en los niveles del enantiómero

negativo derivará en la formación de otros lignanos, como el (-)-lariciresinol, el (-)-secoisolariciresinol o el (-)-matairesinol por medio de la acción de las

pinoresinol/lariciresinol reductasas y la enzima secoisolariciresinol deshidrogenasa (Nakatsubo *et al.*, 2008).

Figura 12

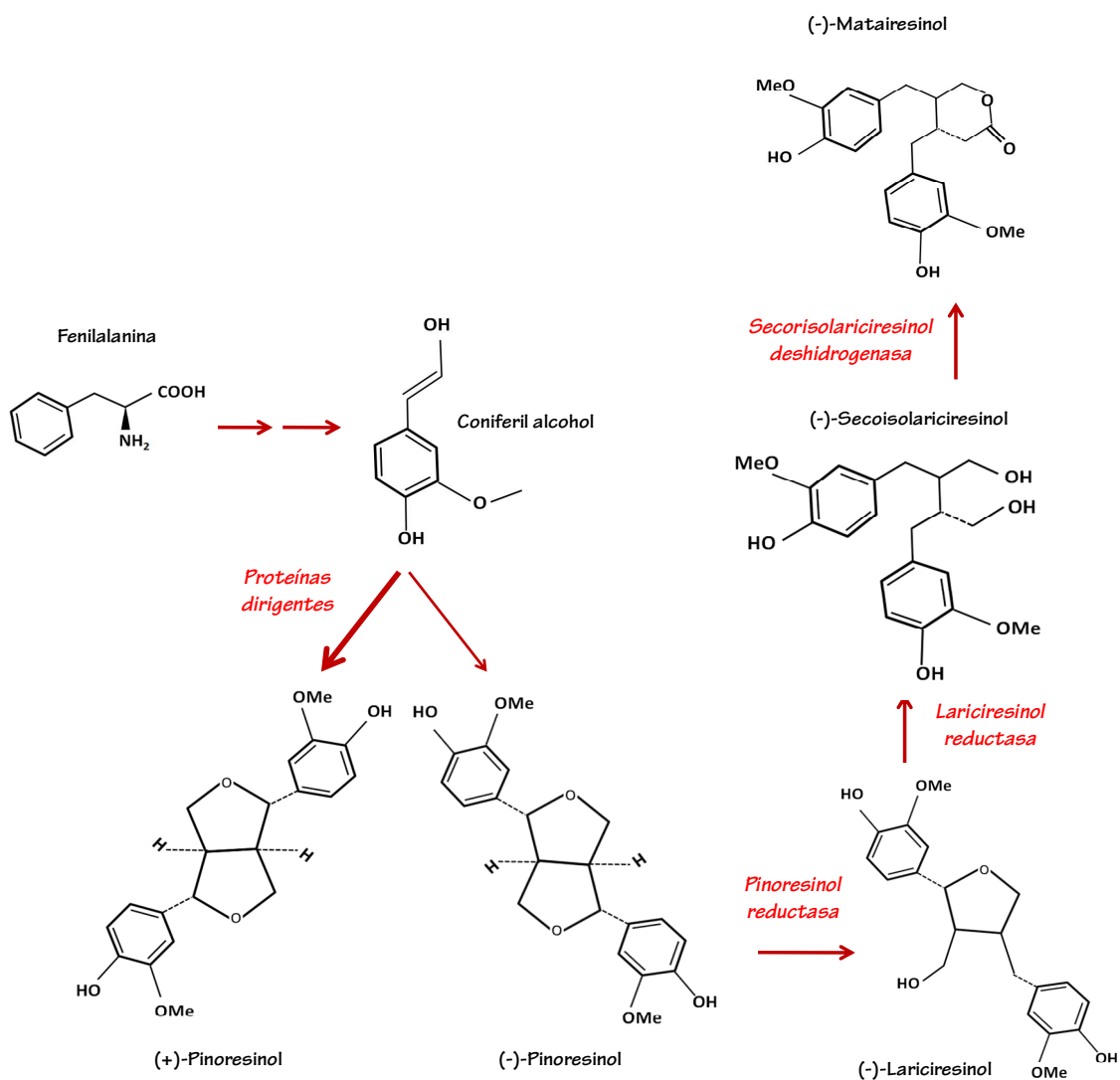


Figura 12. Representación esquematizada de la síntesis de (-)-lariciresinol, (-)-secoisolariciresinol y (-)-matairesinol a partir del incremento de (-)- pinoresinol derivado de la disminución de la actividad de las proteínas DIR.

5-EL CITOESQUELETO Y SU FUNCIÓN EN LAS CÉLULAS FÚNGICAS

Estudios comparativos entre distintas organismos revelan la existencia de un alto nivel de conservación en los intermediarios celulares implicados en la señalización reguladora de la polarización celular en eucariotas. Esta elevada conservación es observada desde eucariotas inferiores, como levaduras, hasta células de mamíferos, como linfocitos o neuronas (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2000).

En las células fúngicas, el establecimiento de la polaridad y el mantenimiento de la asimetría celular son procesos esenciales que gobiernan la morfogénesis, favoreciendo la germinación de las teliosporas y el crecimiento monopolar del micelio. Para que esto tenga lugar es necesaria la existencia de un citoesqueleto organizado, el cual transporta en vesículas las enzimas y los precursores necesarios para el crecimiento de la membrana y las síntesis *de novo* de la pared celular (Berepiki *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2012).

Existen tres tipos de polímeros que conforman el citoesqueleto: los microfilamentos de actina, los microtúbulos (MT) y los filamentos intermedios, aunque los hongos no poseen estos últimos. De

forma general, los MT están implicados en la división nuclear y en el transporte a larga distancia de componentes celulares necesarios para el crecimiento del organismo, mientras que los filamentos de actina parecen ser requeridos para la orientación en la célula de eventos más localizados (Xiang y Plamann, 2003).

Los hongos filamentosos son modelos especialmente atractivos para el estudio de la organización citoesquelética, al crecer sus células por extensión apical y necesitar sus orgánulos migrar largas distancias hasta el extremo en crecimiento (Fischer, 1999).

5.1-EL CITOESQUELETO EN LA QUIMIOTAXIS

El término quimiotaxis se relaciona comúnmente con la modificación en la dirección del desplazamiento celular en presencia de un agente químico externo. Este agente quimioattractante puede estimular en las células un proceso quimiotáctico positivo o negativo (Kaupp *et al.*, 2008) en función de si las atrae o las repele. Cuando la quimiotaxis es positiva, las células se desplazan hacia el punto donde existe una mayor concentración del estímulo químico. Para ello, la señal externa, reconocida por receptores específicos ubicados en las membranas celulares, debe ser transmitida al interior celular. Allí se activarán los mecanismos adecuados para

traducirla en migración a favor de gradiente quimiotáctico (Wang *et al.*, 2011).

El establecimiento de polaridad celular es el evento clave que controla el comienzo de la migración (Vorotnikov, 2011). Para que la polaridad se instaure en las células es necesaria una reorganización del citoesqueleto en el interior celular en respuesta a las señales externas.

5.1.1-La actina y la miosina en la quimiotaxis

La actina contribuye llevar a cabo procesos biológicos tan importantes como la detección de señales ambientales, la internalización de vesículas, el movimiento sobre superficies y la división celular. Estas actividades celulares son complejas y dependen de la interacción de los filamentos con numerosas proteínas (Pollard y Cooper, 2009). Aún es muy poco conocido el papel que la actina juega en el control y la organización nuclear, aunque recientemente se ha observado que procesos nucleares como el *slicing* o la remodelación de la cromatina podrían estar controlados por actina y proteínas asociadas, translocadas al núcleo bajo una estricta regulación (Rando *et al.*, 2000). En el citoplasma, hay una gran cantidad de proteínas de unión a actina que controlan la estabilidad de los filamentos y la formación de extensas redes citoesqueletales. La actina forma

filamentos que proporcionan a las células el soporte mecánico necesario para dirigir las fuerzas del movimiento (Pollard y Cooper, 2009).

Por otro lado, la miosina también desempeña un papel importante en el control de la adhesión celular y la migración celular. La superfamilia de las miosinas es una de las más importantes familias de proteínas. Contienen un dominio con actividad ATPasa que es capaz de transformar la energía química del ATP en movimiento, a través de cambios conformacionales de su estructura (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). En general, la hidrólisis de ATP produce la unión de la cabeza de la miosina al filamento de actina, mientras que la salida del fosfato libre causa la separación de ambas proteínas (Berger *et al.*, 2001).

Eddy *et al.* (2000) observaron que cationes como el Ca^{2+} son requeridos para la correcta actividad de la miosina II durante el establecimiento de la polaridad en pseudópodos y para la retracción de urópodos durante la migración de neutrófilos. La fosforilación de la cadena pesada de la miosina II es indispensable para el mantenimiento de la forma celular y para su motilidad a favor de un gradiente quimiotáctico (Stites *et al.*, 1998).

El GTP resulta ser una molécula importante para la transducción de la señal

que modula la organización de la actina a través de las Rho GTPasas, una gran familia de proteínas G monoméricas relacionadas con Ras (Yang, 2008; Molendijk *et al.*, 2001). Las Rho GTPasas controlan las vías de transducción de señales que relacionan los receptores de la superficie celular con una enorme variedad de respuestas intracelulares (Raftopoulou y Hall, 2004), como la organización del citoesqueleto (Ridley y Hall, 1992).

5.1.2-Las Rho GTPasas

Las Rho GTPasas intervienen en muchos aspectos del comportamiento celular. Además de regular la organización de los filamentos de actina, influyen sobre procesos como la expresión génica, la dinámica de los MT o el tráfico vesicular. (Raftopoulou y Hall, 2004).

Las proteínas GTPasas Rho, dentro de las cuales se incluyen proteínas como Rho, Ras y Cdc42 presentan dos conformaciones interconvertibles: la forma unida a GDP, inactiva, y la forma unida a GTP, activa (Figura 13). La forma unida a GDP de las proteínas Rho está frecuentemente ligada a un GDI (*GDP-dissociation inhibitor*), el cual mantiene a Rho en el citosol en conformación inactiva. Por activación del receptor, Rho se libera del GDI, lo cual permite su activación por los GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*).

Estos factores interactúan primero con Rho, liberando el GDP, siendo a continuación reemplazados por el GTP que da lugar a la conformación activa de la proteína Rho. Se han descrito varios tipos de GEFs, algunos específicos para una determinada Rho-GTPasa y otros de activación más general. Todos las GEFs poseen un dominio DH (de secuencia homóloga a Dbp) con actividad GEF y un dominio PH (de secuencia homóloga a la pleckstrina), que por interacción con lípidos específicos localiza a los GEFs en la membrana plasmática.

Figura 13

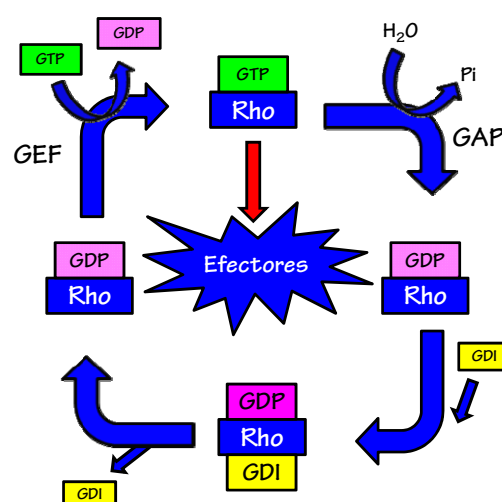


Figura 13. Esquema general de la activación de las proteínas Rho GTPasas (modificado de Fiorentini *et al.*, 2003).

Finalmente, las proteínas GAPs (*GTPase activating proteins*) aumentan la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho, facilitando la hidrólisis del GTP. La forma unida al GDP se acopla de nuevo a un GDI, dando lugar a un complejo

inactivo que vuelve al citosol (Fiorentini *et al.*, 2003).

La unión de GTP conlleva un cambio conformacional de la proteína Rho en la región de unión al efector. Entre los numerosos efectores de Rho, las proteínas quinasas son las mejor caracterizadas. Por ejemplo, la Rho quinasa (ROCK) incrementa la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II y provoca que los filamentos de actina y miosina se ensamblen. Entre los efectores más comunes de Rac y Cdc42 figura la familia de serina/treonina quinasas (Taleisnik, 2006).

5.1.3-El flujo retrógrado de la actina durante la migración celular

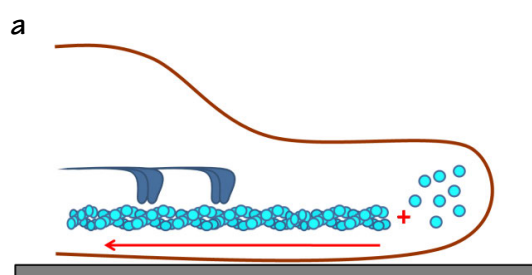
Tanto la actina como la miosina están fuertemente implicadas en la motilidad y la migración de numerosos tipos celulares, como los fibroblastos. En estas células, la actina y la miosina dirigen la formación de estructuras subcelulares específicas, como son los filopodios, los lamelipodios o las fibras de estrés. Durante la formación de estas estructuras específicas envueltas en la migración celular, el complejo actina-miosina también controla el flujo citoplasmático retrógrado y, junto a la fuerza osmótica, regula la presión hidrostática (Stewart *et al.*, 2011).

Así, el proceso conocido como flujo retrógrado de la actina resulta

fundamental en la creación de protrusiones en células animales. Durante este flujo retrógrado, existe un movimiento neto de los microfilamentos hacia la parte trasera de la protrusión a medida que ésta se extiende (Figura 14), como consecuencia de dos procesos simultáneos: el ensamblaje de la actina en la punta del lamelipodio o filopodio y la translocación trasera de los filamentos de actina hacia la base de la protrusión (Case y Waterman, 2015) por interacción de proteínas de anclaje con la matriz extracelular.

Una célula reptante coordina la formación de protrusiones y la unión al sustrato con el avance de toda la célula. La contracción de la parte trasera de la célula empuja al resto de ésta hacia delante y la libera de sus uniones en la parte trasera. Se ha observado que en células mutantes que no poseen miosina II del mohó del cieno *Dictyostelium*, la capacidad de retraer el extremo trasero de la célula está impedida (De Lozanne y Spudich, 1987).

Figura 14



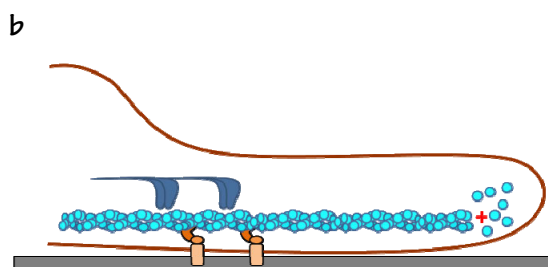


Figura 14. Modificado de Case y Waterman, 2015. Representando () miosina II, () actina G, () actina F, () el sustrato, () la dirección del flujo retrógrado y (+) el extremo de crecimiento neto del filamento de actina: (a) En estado estacionario existe un equilibrio entre la polimerización y el flujo retrógrado. Éste está mediado por la miosina, que desplaza el filamento de actina hacia atrás y evita el movimiento de avance del lamelipodio. (b) El movimiento hacia delante es derivado de la unión celular al sustrato, lo que frena el flujo retrógrado y permite la extensión del lamelipodio mediante la polimerización del filamento.

5.1.4-Los MT en la quimiotaxis

Una organización polarizada de los MT es también observada en los momentos previos al establecimiento de la asimetría celular (Gundersen y Bulinski, 1998). Keays *et al.* (2007), comprobaron que aquellas mutaciones que afectaban al lugar de fijación de las moléculas de GTP a los monómeros de α -tubulina comprometían la polimerización de los MT durante la migración de células neuronales de mamíferos. De igual manera, la formación de una matriz polarizada de MT parece

preceder al inicio de la migración celular en fibroblastos (Gundersen y Bulinski, 1998) los cuales remodelan rápidamente la organización microtubular en respuesta a una determinada señal externa. Si bien la relación entre la organización microtubular y la migración está documentada, el efecto de los MT sobre la motilidad celular podría estar mediado por su interacción con los filamentos de actina, ya que se ha comprobado que ambos colaboran en el mantenimiento de la asimetría celular para llevar a cabo procesos tan diversos como la motilidad, el flujo cortical o acontecimientos que ocurren durante la orientación y la división celular (Rodríguez *et al.*, 2003).

5.2-EL CITOESQUELETO EN LA GERMINACIÓN

Las hifas de los hongos filamentosos son células extremadamente polarizadas, donde el continuo movimiento de vesículas desde el citoplasma de la teliospora hacia la hifa en formación es esencial para el desarrollo del organismo (Fischer *et al.*, 2008; Baumann *et al.*, 2012). Durante la germinación de las esporas fúngicas, el tubo germinativo emerge a partir de un punto localizado de la superficie celular. El primer signo de que una joven hifa emergerá a través del poro germinativo es la acumulación de vesículas en la zona apical (Deacon, 2006), previamente transportadas por el citoesqueleto.

5.2.1-El complejo actina-miosina en la germinación

Las principales evidencias del papel de la actina en la organización interna de las células fúngicas han sido aportadas por los experimentos realizados con *Saccharomyces cerevisiae*, donde los MT no parecen estar relacionados con el transporte de importantes orgánulos y únicamente parecen tener un papel destacado en la orientación de huso mitótico. Son los microfilamentos de actina (interaccionando con la miosina) los que parecen controlar el transporte direccional de las vesículas secretoras hacia las zonas de crecimiento. Por analogía, la actina podría tener un papel similar en el transporte de vesículas a las zonas de crecimiento apical de la hifa en algunos hongos filamentosos (Deacon, 2006), como puede ser el caso de *S. scitamineum*.

Estudios realizados por Bachewich y Heath (1998) en células de *Saprolegnia ferax* demostraron que la F-actina recluta y estabiliza factores citosólicos y de membrana que permiten el crecimiento de una nueva hifa. Por otro lado, Fuchs *et al.* (2005) muestran que la F-actina es esencial para el crecimiento polarizado durante la infección de maíz por *U. maydis*, un patógeno altamente relacionado con *S. scitamineum*. Además, por medio del papel que desempeñan en la organización del

citoesqueleto, las GTPasas Rho son requeridas para el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular así como para el crecimiento polarizado en las células fúngicas (Wendland y Philippsen, 2000).

Numerosos experimentos en presencia de agentes inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto han demostrado la implicación de la actina en el establecimiento de la polaridad celular. El tratamiento de *Aspergillus nidulans* con citocalasina A (Figura 15) da lugar a un crecimiento anómalo de las hifas, las cuales muestran deformaciones globulares en la parte terminal, donde no se detecta actina. Sin embargo, transcurrido algún tiempo, las hifas vuelven a desarrollar un crecimiento normal y se observaba actina concentrada en el extremo apical de crecimiento (Torralba *et al.*, 1998).

Figura 15

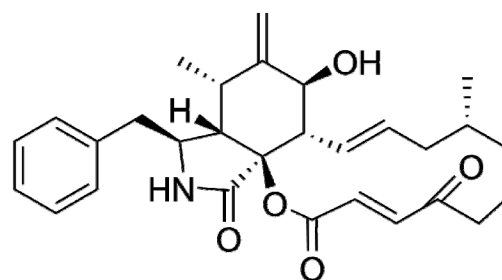


Figura 15. Estructura química de la citocalasina A, agente inhibidor de la dinámica de los filamentos de actina.

La incubación con latrunculina A, Lat A, (Figura 16 a), un agente despolimerizante de los filamentos de actina (Kazami *et al.*, 2011), conduce a la despolimerización de los filamentos en las células de *Saccharomyces cerevisiae*, comprometiendo su esporulación (Taxis *et al.*, 2006).

De igual manera, en *Arabidopsis thaliana* y en plántulas de centeno se ha observado un retraso en el crecimiento cuando los organismos son tratados con latrunculina B (Baluška *et al.*, 2001). Esta molécula (Figura 16 b) bloquea también el correcto desarrollo de las raíces en plantas de maíz y *Arabidopsis* (Baluška *et al.*, 2000). Cuando las hifas de *S. ferax* son tratadas con el mismo agente despolimerizante, se observa en ellas patrones anormales de ramificación y se inhibe el crecimiento polarizado de la célula en crecimiento (Bachewich y Heath, 1998).

Figura 16

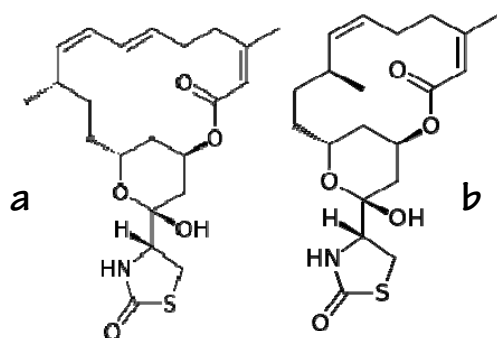


Figura 16. Estructura química de la Lat A (a) y B (b), agentes despolimerizantes de los filamentos de actina.

5.2.2-Los MT en la germinación

El desarrollo óptimo del patógeno *U. maydis* en el interior de su hospedador depende directamente de la capacidad de la hifa de crecer invasivamente. Así, los microfilamentos son esenciales para el establecimiento de un crecimiento polarizado en estas células y participan en la fusión de los esporidios liberados, cuando éstos son sexualmente opuestos. Los microfilamentos de actina son también responsables de la elongación del tubo germinal en las células de *Macrocystis pyrifera*, mientras que los MT participan en la división del núcleo y en su translocación hacia el tubo (Pillai *et al.*, 1992).

Muchos estudios subrayan la importancia del correcto posicionamiento nuclear en el desarrollo de los hongos filamentosos (Morris, 2000; Xiang *et al.*, 1994). Durante la división celular, los MT astrales desplazan el núcleo de *U. maydis* soportando la migración nuclear durante la mitosis y la anafase B (Steinberg *et al.*, 2001), de igual manera que los MT intranucleares y citoplasmáticos de las células de *S. cerevisiae* son requeridos para la correcta orientación y migración de sus núcleos (Jacobs *et al.*, 1988; Page y Snyder, 1993). Los MT son fundamentales en el desplazamiento del núcleo y otros componentes celulares a través del poro germinativo: las hifas son capaces de

formarse en ausencia de MT polarizados (Steinberg, 2007), aunque éstas resultan más cortas y el núcleo falla en su migración hacia el interior de la hifa en crecimiento (Fuchs *et al.*, 2005).

Hay estudios que confirman que la disposición del núcleo en el interior celular también es un proceso relacionado directamente con dinámica de los MT en la raíz de las plantas de maíz (Baluška y Barlow, 1993). Y, de hecho, la organización nuclear se ve profundamente alterada tras el tratamiento de las células con nocodazol, Noc, (Jacobs *et al.*, 1988), un inhibidor de la polarización de los MT (Zieve *et al.*, 1980). De esta forma, alteraciones en la dinámica de los MT conllevan modificaciones en la forma y talla del núcleo. Esto está a menudo relacionado con la diferenciación celular pero también con daño celular (Wilson y Jordan, 1995; Mollinedo y Gajate, 2003; Salinas *et al.*, 2014; Briceño *et al.*, 2015) y enfermedad (Jevtić *et al.*, 2014) mientras que la fragmentación nuclear está relacionada generalmente con muerte celular (Farage-Barhom *et al.*, 2011; Domínguez y Cejudo, 2015).

Objetivos

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el estudio de los mecanismos tempranos de defensa de la caña de azúcar contra la enfermedad del carbón que son desencadenados por las glicoproteínas HMMG y que comprometen la reorganización del citoesqueleto en las teliosporas de *Sporisorium scitamineum*.

En base a este objetivo principal se proponen una serie de objetivos parciales, enumerados a continuación:

1. Analizar el efecto quimioattractante y citoaglutinante de las glicoproteínas HMMG procedentes del jugo de caña de azúcar sobre las teliosporas de *Sporisorium scitamineum*. Relacionar estos efectos con la capacidad defensiva de las plantas.
2. Investigar las diferentes actividades enzimáticas presentes en el conjunto de glicoproteínas del cv. resistente, responsables de la respuesta de resistencia.
3. Analizar la composición de la fracción de proteínas fúngicas producidas por las teliosporas de *S. scitamineum* durante las primeras etapas de la germinación.
4. Comparar la composición de las HMMG procedentes de la caña de azúcar del cv. resistente con la de la fracción de proteínas fúngicas producidas durante la germinación de las teliosporas del carbón.
5. Investigar la organización del citoesqueleto durante el movimiento y la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* y el efecto que las HMMG causan sobre esta organización.
6. Analizar el papel que las proteínas dirigentes y la producción y acumulación de lignanos desempeñan en la respuesta de defensa temprana de la caña de azúcar a la infección por *S. scitamineum*.

Material y Métodos

1-MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

A lo largo del presente trabajo han sido utilizadas dos especies biológicas diferentes:

1. La caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L., hospedante del agente patógeno responsable de la enfermedad del carbón. Fueron utilizados dos cultivares (cvs.) de caña de azúcar que diferían en el grado de susceptibilidad a la enfermedad (Chinea y Rodríguez, 1994): *S. officinarum* L., cv. Mayarí 55-14 (My 55-14), resistente a la enfermedad, y *S. officinarum* L., cv. Barbados 42231 (B 42231), altamente susceptible.

2. El hongo patógeno causante de la enfermedad del carbón, *Sporisorium scitamineum* (Syd.) Piepenbr & Oberw. 2002 (= *Ustilago scitaminea* Sydow & P. Sydow).

1.1-SIEMBRA Y MANTENIMIENTO DE LAS PLANTAS EN EL INVERNADERO

Con el fin de obtener plantas de caña de azúcar de los dos cvs. (My 55-14 y B 42231), se sembraron semillas agámicas de ambos en el invernadero del Real Jardín Botánico Alfonso XIII, propiedad del Departamento de Biología Vegetal I de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Previamente a su siembra en el invernadero, las yemas habían sido desinfectadas mediante tratamiento hidrotérmico (THT), por incubación en agua estéril durante 48 h y sometidas a una temperatura de 52°C durante 3 h. Las semillas desinfectadas fueron sembradas sobre vermiculita saturada de agua destilada y conservadas durante 4 días en una cámara de plantas, a temperatura y humedad constantes (35°C y 90% de humedad relativa) y en oscuridad, para promover su germinación. Una vez germinadas, fueron transferidas al suelo del invernadero, de tipo arcilloso con un 25% de arena (p/p). El suelo fue fertilizado en el momento de la siembra de las yemas con nitrógeno (150 kg·ha⁻¹), fósforo (75 kg·ha⁻¹) y potasio (120 kg·ha⁻¹), (Legaz *et al.*, 2006). Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de iluminación natural y riego controlado mediante un sistema de riego automático. Durante los 8 meses anteriores a su utilización, las plantas fueron regadas durante 15 min cada 2 días. El último mes fueron sometidas a riego diario. La Figura 17 muestra una fotografía de las plantas en el interior del invernadero.

1.2-AISLAMIENTO DEL PATÓGENO

El patógeno *S. scitamineum* fue utilizado en dos estadios de su ciclo vital, en forma de teliospora y como esporidio haploide.

Figura 17



Figura 17. Imagen de las plantas de caña de azúcar en el interior del invernadero del Real Jardín Botánico de la Universidad Complutense de Madrid.

1.2.1-Aislamiento de teliosporas del carbón

Las teliosporas de *S. scitamineum* fueron aisladas a partir de látigos crecidos sobre plantas enfermas del cv. B 42231, cultivadas en el Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) en Cuba. Las teliosporas se obtuvieron a partir de la parte central del látigo, separándose de otros restos por tamización a través de una malla y con ayuda de una espátula y pinzas. El proceso

se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Las esporas se mantuvieron en condiciones de sequedad y oscuridad en un desecador hasta su utilización.

1.2.2-Obtención de esporidios sexualmente diferenciados a partir de teliosporas

Teliosporas de *S. scitamineum* (1,0 mg) fueron pre-hidratadas durante 12 h en agua destilada ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Posteriormente, una muestra de la suspensión fue sembrada con un asa de siembra mediante la técnica de agotamiento por estrías en placas con medio patata-dextrosa-agar o PDA (potato dextrose agar) al 4,2% (p/v) conteniendo estreptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 μM . El medio PDA, a su vez, estaba formado por patata-dextrosa o PDB (potato dextrose broth) al 2,7% (p/v) y agar al 1,5% (p/v). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24 h en oscuridad y posteriormente transferidas a una estufa de cultivo JP Selecta (Incudigit SA, Barcelona, España) donde se mantuvieron a 26°C en oscuridad durante 2 días.

Transcurrido ese tiempo, se recogieron 6 colonias aisladas con el asa de siembra (se denominaron A, B, C, D, E y F), las cuales se sembraron independientemente en nuevas placas de PDA al 4,2% (p/v) que se incubaron durante

2 días a 26°C. Tras su crecimiento, las colonias se introdujeron en tubos eppendorf independientes que contenían 1,0 mL de agua destilada.

Para determinar el *mating type* o tipo sexual (+ o -) de cada una de las 6 colonias aisladas se realizaron pruebas de cruzamiento entre todas ellas, teniendo en cuenta todos los emparejamientos posibles. En cada experimento, gotas de 10 µL de células fúngicas en suspensión (5 µL procedentes de cada una de las dos colonias) se incubaron en placas de PDA al 4,2% (p/v) conteniendo estreptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 µM y carbón activo al 1,0% (p/v).

Las placas fueron incubadas durante 48 h en oscuridad a 25°C. El carbón activo permitía visualizar fácilmente la aparición de micelio dicariótico en las placas, resultado de la conjugación de esporidios compatibles (+/-). El cruzamiento resultó positivo cuando derivó en la aparición de micelio y negativo cuando resultó en la aparición de colonias brillantes, lo cual significaba ausencia de conjugación (Figura 18).

A la colonia que había sido denominada como A se le asignó, arbitrariamente, el signo (+), lo que derivó en que las demás colonias tomaran signo positivo o negativo en función de si habían podido o no conjugarse con la primera. Así, A, B, C y D fueron consideradas colonias

positivas, (+), mientras que E y F fueron consideradas colonias negativas, (-), sexualmente opuestas y compatibles con A. Los esporidios aislados fueron conservados en un ultracongelador NuAire Glacier (NuAire Inc., Plymouth, MA) a -80°C en presencia de glicerol al 17% (v/v) hasta su utilización.

Figura 18

	A	B	C	D	E	F
A	N	N	N	N	S	S
B		N	N	N	S	S
C			N	N	S	S
D				N	S	S
E					N	N
F						N

Figura 18. Esquema de los cruzamientos realizados entre las 6 colonias aisladas (A-F) de esporidios de *S. scitamineum*. N (No), ausencia de micelio; S (Si), presencia de micelio.

2-OBTENCIÓN DE TEJIDO PARA LA EXPERIMENTACIÓN A PARTIR DE PLANTAS DE MY 55-14 Y B 42231 INOCULADAS Y NO INOCULADAS

2.1-INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS

2.1.1-Preparación de esporidios compatibles

En los experimentos de inoculación se utilizaron esporidios compatibles (+ y -)

previamente aislados según describe el apartado 1.2.2 (*Obtención de esporidios sexualmente diferenciados a partir de teliosporas*), que se conservaban a -80°C en glicerol al 17% (v/v). Se eligieron las colonias A y E, por haberse confirmado que producían micelio dicariótico al ponerse en contacto (Figura 18).

El glicerol fue eliminado de las muestras por centrifugación a $9.000 \times g$ durante 1,0 min en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) y los esporidios, en el precipitado, fueron resuspendidos en 1,0 mL de agua destilada. Se realizaron sucesivas diluciones de las muestras hasta que éstas alcanzaron valores de densidad óptica de 0,7-0,8 unidades tras su medición a 600 nm en un espectrofotómetro Unicam Helios β (Spectronic Unicam, Cambridge, UK), lo que se corresponde con valores de densidad celular de $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹ (Santiago *et al.*, 2012a). De esta manera se garantizaba que ambos tipos de esporidios (+ y -) se encontraban en igual proporción y a una concentración óptima para garantizar la infección.

2.1.2-Procedimiento de inoculación

Plantas de 10 meses de edad de los cvs. My 55-14 y B 42231 (doce plantas por cada variedad) fueron inoculadas usando una jeringuilla Hamilton con 50 μL de una

suspensión de $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹ (mezcla 1:1 de esporidios (+) y (-) preparada en el instante anterior a la inoculación). La inyección fue llevada a cabo en la porción apical de los tallos. El inóculo fue introducido en el meristemo (lugar de desarrollo del patógeno en condiciones naturales), 3 cm por encima de la primera hoja desarrollada.

Las doce plantas inoculadas con el patógeno (plantas inoculadas, I) habían sido tomadas de cuatro plantones diferentes. Seis de las plantas inoculadas fueron recogidas a las 3 h de la inoculación, y las otras 3 plantas, a las 6 h post-inoculación. Siguiendo exactamente el mismo procedimiento, doce plantas fueron inyectadas con 500 μL de agua destilada (plantas inyectadas con agua, A) y, finalmente, otras seis plantas que no habían sido inoculadas fueron tomadas como control (plantas control, C). De cada una de las cañas se recogió el tallo completo. La tercera hoja desarrollada fue tomada únicamente de las plantas control y de aquellas plantas recogidas 6 h post-inoculación. El proceso general se esquematiza en la Figura 19.

Figura 19

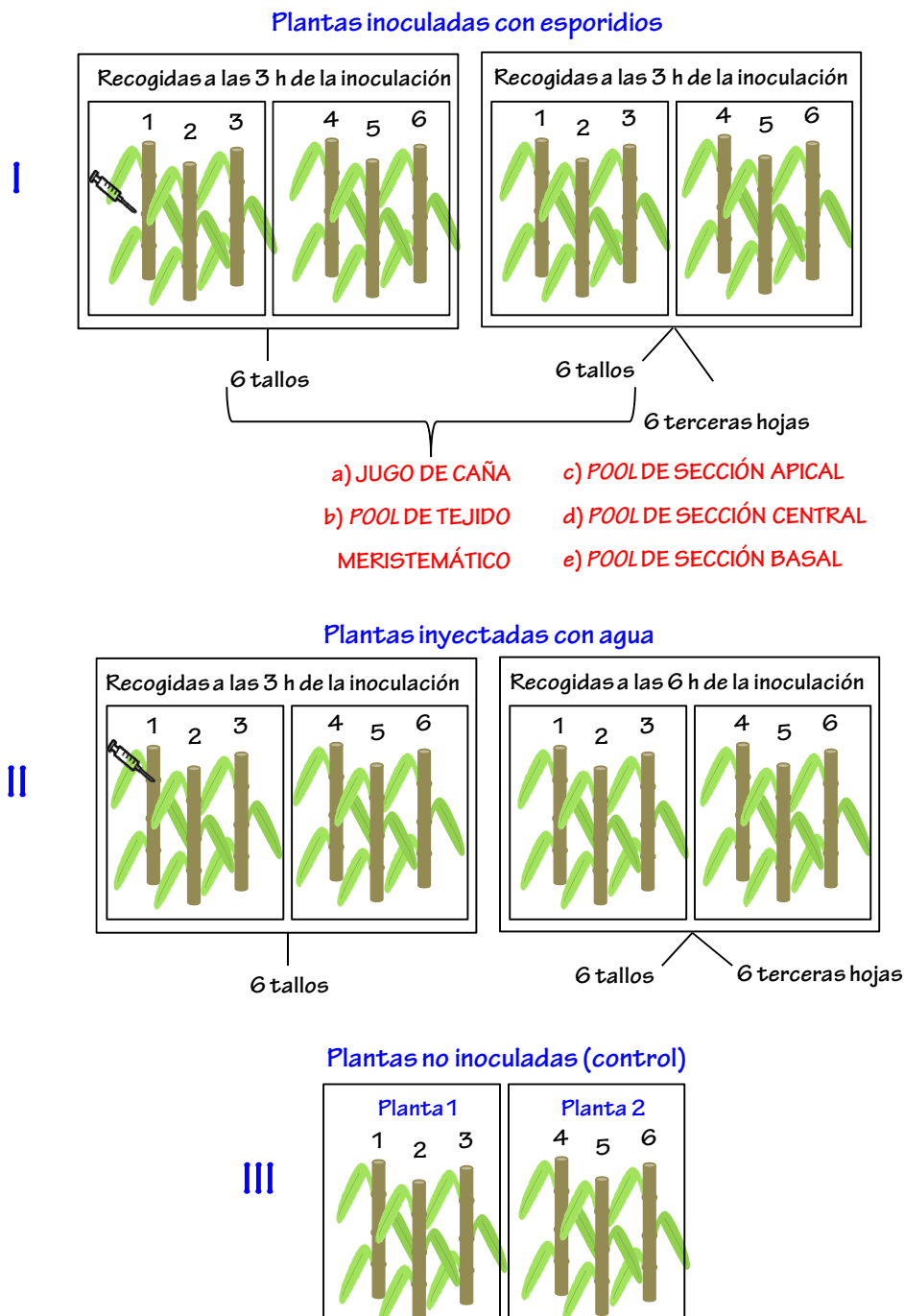


Figura 19. Esquema de la metodología aplicada para la obtención de jugo de caña (a), tejido meristemático (b) y tejido foliar (c, d, e) a partir de plantas de caña de azúcar no inoculadas (III), inyectadas con agua (II) o inoculadas con una mezcla de esporidios compatibles (+ y -) (I). En cada caso (control/inyección con agua/ inoculación con esporidios) se obtuvieron 6 tallos y 6 hojas con los que se realizaron *pools* correspondientes al jugo extraído, el tejido meristemático y el tejido foliar para cada sección de hoja.

2.2-OBTENCIÓN DE TEJIDO MERISTEMÁTICO Y FOLIAR

Segmentos de 3 cm fueron obtenidos de cada uno de los tallos (cortando 1,5 cm por debajo y por encima del que había sido el punto de inoculación). De cada segmento se extrajo el meristemo, y se realizó un *pool* de tejido meristemático que fue inmediatamente macerado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta su utilización. El resto del tallo se conservó a -20°C para extraer de él el jugo de caña. Por otro lado, las hojas recogidas se fraccionaron en secciones de 10 cm de longitud: sección basal (cortando 10 cm desde la base de hoja), sección media (desde los 25 a los 35 cm desde la base) y sección apical (desde los 50 a los 60 cm desde la base). De igual manera, se realizó un *pool* por cada sección foliar y tratamiento (ver Figura 19). Los diferentes *pools* fueron inmediatamente macerados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C .

3-OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS PARA LOS EXPERIMENTOS

3.1-EXTRACCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS HMMG Y MMMG A PARTIR DE TALLOS DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

Para la extracción de las fracciones glicoproteicas de mediano y alto peso

molecular, MMMG y HMMG respectivamente, fueron utilizados los tallos correspondientes a plantas no inoculadas (control) y a plantas inoculadas con esporidios conjugantes recogidas 6 h post-inoculación.

3.1.1-Procesamiento del jugo previo a su separación

Los tallos de ambos cvs. fueron molidos mecánicamente, obteniéndose el jugo de cada uno de ellos (jugo crudo). Posteriormente éste se centrifugó a 5.000 x g durante 15 min a 4°C , utilizándose una centrífuga Beckman modelo J2-21 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). El sobrenadante fue filtrado a vacío a través de papel Whatman N.º 1 (W. & R. Blanton Ltd., Maidstone, UK), según describen Legaz *et al.*, (1995), obteniéndose el jugo clarificado.

3.1.2-Obtención de las glicoproteínas por cromatografía de exclusión molecular

La separación de las glicoproteínas MMMG y HMMG a partir del jugo de caña procesado se llevó a cabo mediante cromatografía de penetrabilidad, utilizando un sistema formado por dos columnas de Sephadex, G-10 y G-50 (Omnifit System, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA), con las siguientes características (Tabla III):

Tabla III

	G-10	G-50
DIÁMETRO (cm)	2,5	2,5
LONGITUD (cm)	20	35

Tabla III. Características de las columnas utilizadas para la separación de glicoproteínas de caña.

Previo a la separación del jugo de caña, las columnas fueron equilibradas con tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 (de Armas *et al.*, 1989) y calibradas mediante la filtración de una disolución en el mismo tampón compuesta por azul dextrano 29 mM, polímero de unidades de D-glucosa de alto peso molecular ($P_m = 2.000.000$), y CoCl_2 0,33 M ($P_m = 273,95$). Al tratarse de sustancias coloreadas, podrían detectarse visualmente los parámetros correspondientes al V_0 (volumen muerto) y al V_t (volumen total).

Para calibrar la columna de Sephadex G-10 se filtraron 3,5 mL de la disolución preparada, recogiendo fracciones de 2 en 2 mL. Tras desecharse los primeros 28 mL, se recogieron los siguientes 42 mL (zona correspondiente a la elución del azul dextrano y el CoCl_2) y se realizó un lavado de 140 mL.

Se midió la absorbancia del volumen recogido a 620 nm y 510 nm, por tratarse de los máximos de absorción del azul dextrano y del CoCl_2 respectivamente,

obteniéndose el perfil de elución para G-10 representado en la Figura 20. El pico de absorbancia máxima a 620 nm se detectó a los 36 mL y el pico de absorbancia máxima a 510 nm a los 52 mL de elución. Ya que el azul dextrano solo comenzó a visualizarse a partir de los 30 mL, el volumen muerto (V_0) fue desechado en las separaciones posteriores de las muestras de caña. Por otro lado, el CoCl_2 terminó de eluir a los 60 mL, por lo que se consideró este volumen como el volumen total (V_t) de elución de la muestra aplicada.

Figura 20

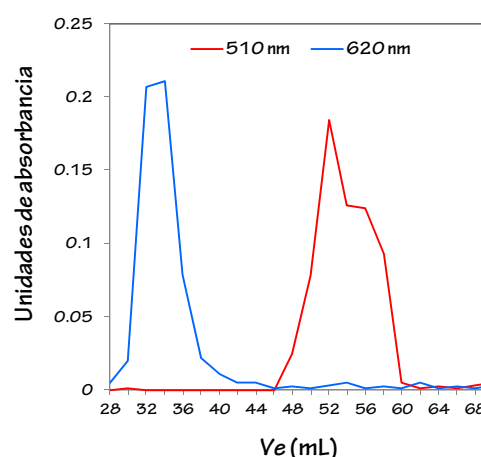


Figura 20. Perfil de elución de la disolución de azul dextrano 29 mM y CoCl_2 0,33 M en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 a través de una columna rellena con Sephadex G-10. Ve: volumen de eluato.

Para calibrar la columna de Sephadex G-50 se filtraron 6 mL de la disolución preparada a partir de azul dextrano y CoCl_2 , eluyéndose con el mismo tampón y recogiendo fracciones de 2 en 2 mL.

Fueron desechados los primeros 48 mL, valorándose la absorbancia de los siguientes 140 mL. El primer pico se detectó a los 58 mL, correspondiendo al máximo de absorción a 620 nm y el segundo pico, para el máximo de absorción a 510 nm, a los 144 mL. Se determinaron los valores de V_0 y V_t a los 48 mL y a los 180 mL, respectivamente (Figura 21).

Figura 21

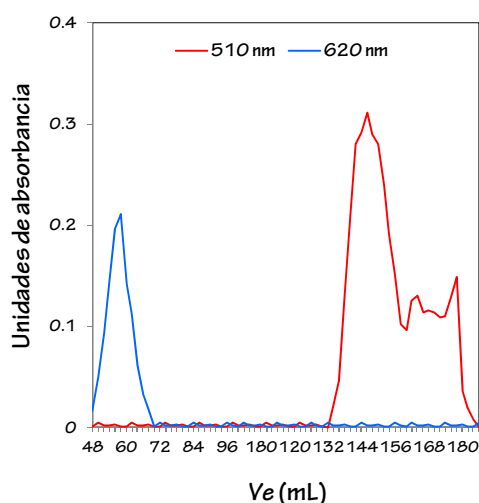


Figura 21. Perfil de elución de la disolución de azul dextrano 29 mM y CoCl_2 0,33 M en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 a través de una columna rellena con Sephadex G-50. Ve: volumen de eluato.

Tras la calibración, se procedió a la filtración del jugo de caña anteriormente procesado. Para ello, se tomaron en cuenta los pesos moleculares de las glicoproteínas HMMG y MMMG (alrededor de 1.730 y 870 kDa respectivamente) y su relación con los perfiles de elución anteriormente descritos, con el fin de lograr una separación eficaz de los dos grupos de glicoproteínas

en base a las diferencias en sus pesos moleculares.

El protocolo que se detalla a continuación para separar las glicoproteínas HMMG y MMMG del total del jugo extraído a partir de plantas inoculadas y no inoculadas del cv. My 55-14 fue llevado a cabo de la misma manera sobre el jugo de las plantas del cv. B 42231.

Se filtraron 5 mL del jugo clarificado a través de la columna de Sephadex G-10 embebida en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8. Según los resultados de la calibración, los 28 mL iniciales (correspondientes al V_0) debían ser eliminados, recogiendo desde los 29 hasta los 40 mL (en total, los siguientes 12 mL), por tratarse de la región de elución del azul dextrano, que coincide con la de elución de la mezcla de glicoproteínas de algo y mediano peso molecular (HMMG y MMMG, respectivamente).

El proceso fue repetido, alcanzando un volumen resultante de 24 mL (12 mL + 12 mL), el cual fue llevado a un volumen de 4 mL en un concentrador a vacío Thermo SPD111V (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Estos 4 mL fueron eluidos a través de la columna Sephadex G-50. El volumen muerto (esta vez 48 mL) fue descartado. Los siguientes 20 mL (la región de elución del azul dextrano) contenían las glicoproteínas de alto peso molecular

(HMMG) y los 58 mL posteriores (la zona comprendida entre la salida del azul y la aparición del CoCl_2) las glicoproteínas de mediano peso molecular (MMM_G). Ambos volúmenes fueron concentradas hasta aproximadamente 5-6 mL en el mismo concentrador a vacío.

3.2-OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS FÚNGICAS SEGREGADAS POR LAS TELIOSPORAS DURANTE SU GERMINACIÓN

Se incubaron 80 mg de teliosporas en agua destilada ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) durante 1,5, 3, 4,5 ó 6 h a 22°C . Tras la incubación las muestras fueron sometidas a centrifugación en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) a $5.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El precipitado en cada caso fue eliminado y el sobrenadante, conteniendo las proteínas fúngicas o FP (*Fungal Proteins*) liberadas por las teliosporas durante su germinación, fue filtrado a través de papel Whatman N.º 1 (W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK) y concentrado hasta un volumen final de 2 mL en un concentrador a vacío Thermo SPD111V (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). La concentración final de las proteínas en cada caso fue determinada siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951) según lo descrito en el apartado 9 (*Valoración de proteínas*).

3.3-OBTENCIÓN DE FP CONTENIENDO ARGINASA INACTIVADA

Un volumen de 3 mL del total de proteínas segregadas por las teliosporas, obtenido tras 6 h de germinación y conteniendo arginasa fúngica activa o AFA (*Active Fungal Arginase*) fueron incubados en presencia de HgSO_4 5 mM durante 1,0 h a 37°C y agitación constante ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$). La actividad arginasa tras el proceso de inactivación fue valorada siguiendo el método de microdifusión de Conway (1962), modificado por Legaz y Vicente (1982), detallado en el apartado 8.2 (*Valoración de actividad arginasa*). Se comprobó que la actividad arginasa contenida en el total de FP había disminuido, pero no había sido eliminada completamente. Por ello, las FP (1,5 mL), conteniendo actividad arginasa residual, fueron incubadas de nuevo en presencia de HgSO_4 , esta vez 10 mM y durante 2 h, con el fin de inhibir completamente la actividad de la enzima.

Entonces, el producto de la secreción, conteniendo actividad arginasa parcial/totalmente inactivada o IFA, (*Inactivated Fungal Arginase*), fue dializado frente a agua destilada durante 24 h a 4°C en agitación constante, para eliminar el exceso de HgSO_4 , no ligado a las proteínas. Las FP conteniendo arginasa parcial o totalmente inactivada, (IFA), fueron

utilizadas en los ensayos de competencia y germinación, al igual que el total de FP conteniendo arginasa fúngica activa o AFA (*Active Fungal Arginase*).

3.4-SEMI-PURIFICACIÓN DE ARGINASAS CONTENIDAS EN LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG O EN LAS FP

La arginasa de caña o SCA (*Sugar cane arginase*) contenida en las glicoproteínas HMMG producidas por plantas inoculadas o no inoculadas de ambos cultivares (My 55-14 y B 42231), así como las arginasas fúngicas de las distintas FP obtenidas fueron semi-purificadas mediante cromatografía de afinidad en columnas de agarosa activada con bromuro de cianógeno (Legaz *et al.*, 2004) a las cuales se unió ureasa del líquen *Evernia prunastri* (L.) recolectado de la corteza de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* en el encinar de “La Quinta” (El Pardo, Madrid, España).

3.4.1-Obtención de ureasa a partir del líquen *E. prunastri*

Para la obtención de ureasa de *E. prunastri* se utilizó el método de Legaz *et al.* (2001) con modificaciones. 2 g de talo líquénico fueron embebidos en 40 mL de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9, conteniendo urea 40 mM durante 4 h a temperatura ambiente en oscuridad. Este medio fue filtrado a través de papel Whatman® 3MM

(W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK) y posteriormente dializado frente a 5 L de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9, durante 24 h a 4°C en oscuridad y agitación continua (125 oscilaciones·min⁻¹). El volumen obtenido tras el dializado (35 mL) fue concentrado en un concentrador a vacío Thermo SPD111V (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) hasta un volumen de 10 mL. La cantidad de proteínas fue cuantificada en el extracto resultante siguiendo el método de Potty (1969) con ligeras modificaciones.

Para ello, 0,5 mL de la muestra fueron mezclados con 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (v/v) y sometidos a centrifugación a 9.000 x g en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) durante 10 min. El sobrenadante, conteniendo los fenoles, fue eliminado y el precipitado fue resuspendido en 0,25 mL de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9, donde se valoró la concentración de proteínas según describe en el apartado 9 (*Valoración de proteínas*).

La existencia de actividad ureasa en el segregado líquénico fue confirmada antes de su utilización en las columnas de agarosa por valoración mediante el método de Conway, descrito en el apartado 8.1 (*Valoración de actividad ureasa*).

3.4.2-Preparación de columnas de agarosa activada

Tras confirmar la existencia de actividad ureasa en el segregado producido por *E. prunastri* se procedió a su utilización para la semi-purificación de las distintas arginasas por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa activada con bromuro de cianógeno (Sigma St. Louis, MO, USA). Se prepararon lechos de agarosa hidratando 2 g de ésta con 20 mL de agua Milli-Q® y 4 mL de ureasa purificada ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La hidratación tuvo lugar durante 16 h a 4°C en oscuridad. Posteriormente se añadieron

0,6 g de glicina y la mezcla se mantuvo 8 h a temperatura ambiente (Walters, 1985). La agarosa activada unida a ureasa fue entonces empaquetada en columnas de 3 cm de largo por 1,5 cm de diámetro interno. Las columnas fueron lavadas con 300 mL de tampón fosfato 10 mM pH 6,8 a un flujo constante de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.4.3-Obtención de fracciones de arginasa semi-purificada

El proceso completo para la obtención de la arginasa semi-purificada se esquematiza en la Figura 22.

Figura 22

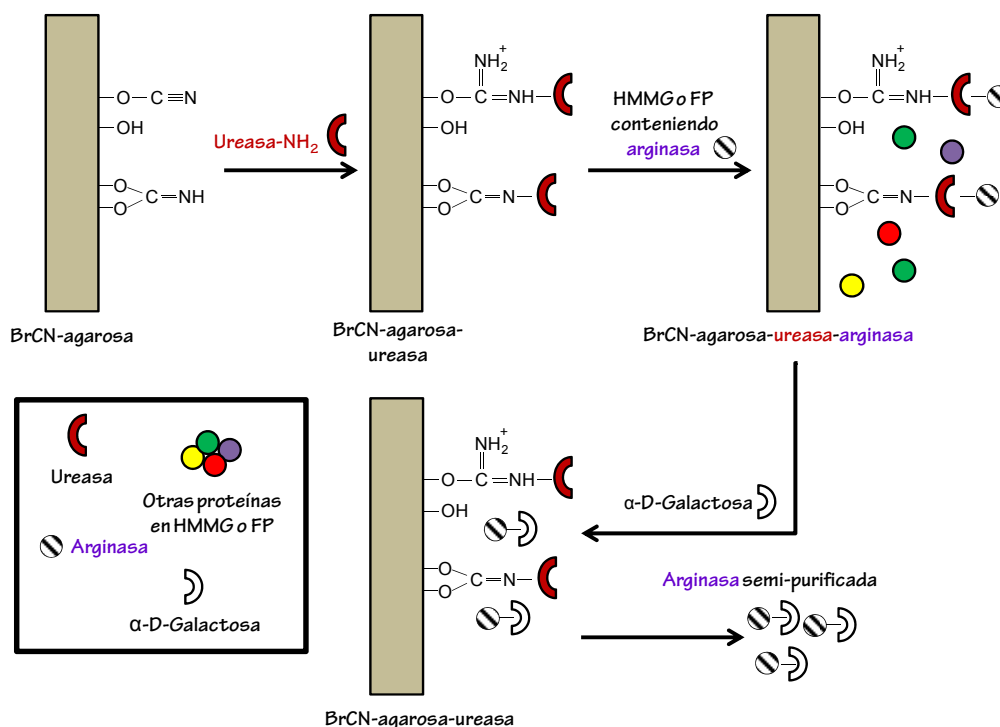


Figura 22. Esquema del proceso de semi-purificación de la arginasa contenida en el total de glicoproteínas HMMGo FP. Br-CN: bromuro de cianógeno. Metodología detallada en el texto, apartado 3.4.3.

En primer lugar, se cargaron 1,5 mL de proteínas HMMG de plantas no inoculadas de ambos cvs. o FP segregadas a las 1,5,3,4,5 ó 6 h ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en las columnas, que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, las columnas fueron abiertas para eliminar las proteínas no retenidas en las columnas y posteriormente lavadas con 30 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 6,8. Las distintas arginasas, retenidas por enlaces de afinidad con las moléculas de ureasa, fueron eluidas entonces con α -D-galactosa 50 mM preparada en tampón fosfato 75 mM, pH 6,8. EL azúcar desplazó a las arginasas que previamente se habían unido a la ureasa (Legaz *et al.*, 2004).

Fueron recogidas 8 fracciones de 2 mL, las cuales fueron dializadas frente a 2 L de tampón fosfato 10 mM, pH 6,8, para eliminar el exceso de α -D-galactosa. En cada fracción, la cantidad de proteínas fue cuantificada por el método de Lowry *et al.* (1951) según se detalla en el apartado 9 (*Valoración de proteínas*), así como la actividad arginasa, por el método de microdifusión de Conway (1962) modificado por Legaz y Vicente (1982), descrito en el apartado 8.2 (*Valoración de actividad arginasa*). En cada caso, la fracción que contenía el pico de actividad arginasa fue utilizada en experimentos posteriores.

3.5-OBTENCIÓN DE TUBULINA SEMI-PURIFICADA A PARTIR DEL LISADO CELULAR DE *S. scitamineum*

El proceso de semi-purificación de la tubulina monomérica a partir del lisado celular de teliosporas de *S. scitamineum* se llevó a cabo según el método de Castoldi y Popov (2003), con modificaciones. A lo largo del proceso se alternó la utilización de tampón polimerizante y despolimerizante, cuyas composiciones son las siguientes:

-Tampón polimerizante: PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis (2-etanosulfónico)) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1,0 M, MgCl_2 10 mM y EDTA 20 mM. El tampón fue ajustado a pH 6,9 con KOH 1,0 M y conservado a 37°C hasta su utilización.

-Tampón despolimerizante: MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 mM y CaCl_2 1,0 mM. El tampón fue ajustado a pH 6,6 con HCl y conservado a 4°C hasta su utilización

En primer lugar, 30 mg de teliosporas fueron macerados durante 15 min en presencia de 5,5 mL de tampón despolimerizante y 300 mg de alúmina (Sigma, St. Louis, MO, USA). Tras la maceración, la muestra fue centrifugada a $22.000 \times g$ durante 1,0 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL-90 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Al volumen de sobrenadante resultante (5 mL) se le

añadió el mismo volumen de glicerol y el mismo volumen de tampón polimerizante al que, justo antes de su utilización se le añadió ATP y GTP a una concentración final de 1,5 mM y 0,5 mM, respectivamente. La mezcla formada por el sobrenadante, el glicerol y el tampón polimerizante (1:1:1 v/v) fue incubada 1,0 h a 37°C, para favorecer la polimerización de la tubulina. La muestra se ultracentrifugó a 160.000 x g durante 30 min a 37°C.

El precipitado fue resuspendido en 20 mL de tampón despolimerizante y se conservó en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo la muestra volvió a ser centrifugada, esta vez a 80.000 x g durante 30 min y a 4°C. En este punto, la fracción sobrenadante contenía la tubulina semi-purificada. La concentración de proteínas en la muestra se valoró siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951) según se detalla en el apartado 9 (*Valoración de proteínas*). La muestra fue conservada a -20°C hasta su utilización.

4-EXTRACCIÓN DE LIGNANOS TOTALES A PARTIR DE TEJIDO DE CAÑA DE AZÚCAR

La extracción se realizó a partir de tejido meristemático procedente de plantas del cv. sensible (B 42231) y resistente (My 55-14) no inoculadas, inyectadas con agua o inoculadas con esporidios, que habían sido

recogidas del invernadero 6 h post-inoculación (ver apartado 2 (*Obtención de tejido para la experimentación a partir de plantas de My 55-14 y B 42231 inoculadas y no inoculadas*). El proceso de extracción se esquematiza en la Figura 23.

Se partió de 300 mg de cada uno de los tejidos, a las que primeramente se añadieron 5 mL de éter de petróleo. La mezcla se homogeneizó con una varilla de vidrio cada 30 min hasta un total de 3 veces, retirándose cada vez la fase orgánica para ser reemplazada por nuevo éter de petróleo. Los últimos 5 mL de éter de petróleo añadidos fueron retirados transcurridas 24 h. La muestra desgrasada fue llevada a total sequedad bajo corriente de aire.

A continuación, las muestras fueron incubadas durante 4 h a 35°C en agitación (125 oscilaciones·min⁻¹) en presencia de 5 mL de metanol al 70% (v/v) preparado en agua Milli-Q®. Cada 30 min las muestras eran agitadas en vórtex y devueltas a la incubación. A continuación los tejidos fueron disgregados por inmersión en un baño de ultrasonidos (Ultrasons-Medi II, JP Selecta, Barcelona, España) durante 10 min a 20 KHz. Los restos sólidos de tejido fueron eliminados por filtración a vacío de las muestras.

Figura 23

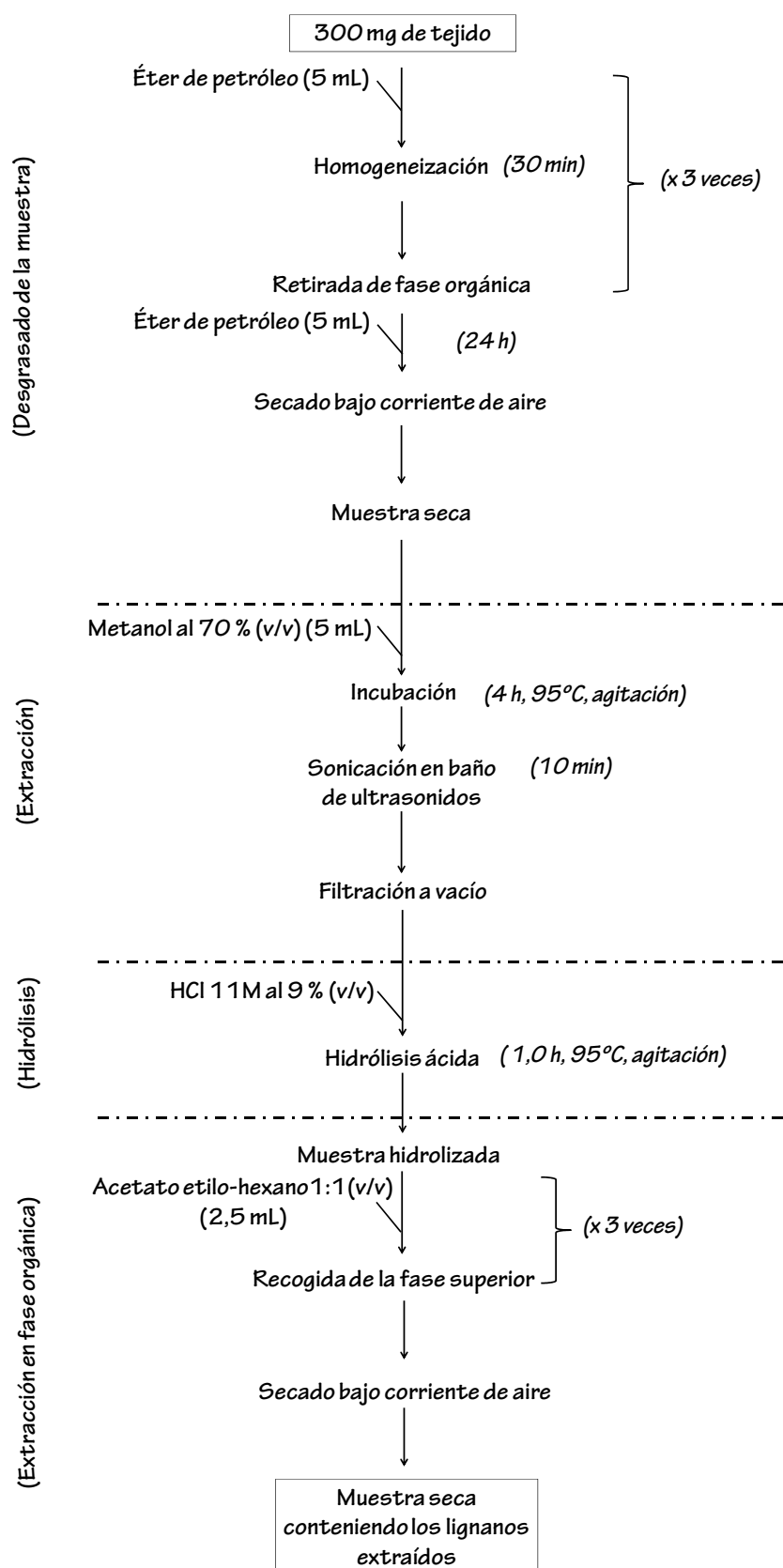


Figura 23. Esquema del protocolo seguido para la extracción de lignanos a partir de tejido meristemático de plantas de caña de azúcar. Metodología detallada en el texto, apartado 4.

Para la obtención de los lignanos conjugados, las muestras se sometieron a hidrólisis ácida en presencia de HCl en tubos cerrados herméticamente. A cada muestra se le añadió un 9% de HCl (v/v) 11 M, de manera que la concentración final fuera de 1,0 M. La incubación tuvo lugar durante 1,0 h a 95°C y agitación constante (125 oscilaciones·min⁻¹). Las muestras se atemperaron tras la incubación.

Tras la hidrólisis, los lignanos fueron extraídos con 2,5 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de acetato de etilo y hexano. Éstas fueron agitadas en vórtex durante 30 s, dejándose entonces reposar durante 2 min para lograr una correcta separación de las fases. La fase orgánica superior, conteniendo los lignanos extraídos fue recogida. El proceso fue repetido 2 veces más y las 3 fases orgánicas obtenidas fueron juntadas y llevadas a sequedad bajo corriente de aire.

5-SEPARACIÓN DE LIGNANOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

Los extractos de lignanos obtenidos según el protocolo descrito en el apartado 4 (*Extracción de lignanos totales a partir de tejido de caña de azúcar*) a partir de tejido meristemático de plantas de ambos cvs. (My 55-14 y B 42231) no inoculadas, inyectadas con agua e inoculadas con esporidios compatibles fueron separados

por electroforesis capilar zonal, CZE (*Capillary zone electrophoresis*).

5.1-PREPARACIÓN DE PATRONES DE LIGNANOS PARA SU SEPARACIÓN POR CZE

Como patrones se utilizaron los siguientes lignanos comerciales, todos de Sigma (Sigma St. Louis, MO, USA): pinoresinol, lariciresinol, isolariciresinol, matairesinol y secoisolariciresinol. Concentraciones crecientes (0,78 µg·mL⁻¹-0,1 mg·mL⁻¹) de cada uno de los lignanos fueron preparadas en tampón borato sódico 21 mM, pH 9, conteniendo SDS 22 mM y un 20% (v/v) de acetonitrilo puro. Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de 0,45 µm (Hamilton® Co., Nevada, USA) para ser analizadas por electroforesis capilar bajo las mismas condiciones que las muestras problema 5.3 (*Condiciones para la separación de lignanos por CZE*).

5.2-PREPARACIÓN DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS DE LIGNANOS PARA SU SEPARACIÓN POR CZE

Los lignanos contenidos en las diferentes fracciones, aislados mediante el protocolo descrito en el apartado 4 (*Extracción de lignanos totales a partir de tejido de caña de azúcar*), fueron resuspendidos en 120 µL del mismo tampón utilizado para disolver los patrones comerciales. Posteriormente, las

muestras se filtraron a través de filtros de $0,45\mu\text{m}$ (Hamilton® Co., Nevada, USA). Los patrones comerciales y las diferentes muestras fueron separados mediante CZE bajo las condiciones descritas a continuación.

5.3-CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN DE LIGNANOS POR CZE

Los lignanos fueron separados mediante un sistema de CZE P/ACE™ MDQ Glycoprotein System de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). El sistema contaba con un detector Diode Array incorporado, con un ancho de banda de 6 nm. Los electroferogramas resultantes de cada análisis podrían ser posteriormente visualizados mediante un ordenador acoplado al sistema, y utilizando el programa 32 Karat™ (v. 4.0).

Se utilizó un capilar de sílice fundida recubierto de poliimida (Beckman Coulter, USA) de 57 cm de longitud total efectiva, $75\mu\text{m}$ de diámetro interno y $375\mu\text{m}$ de diámetro externo, acondicionado como se describe a continuación:

- a) Se realizaron tres lavados sucesivos a 60°C , con NaOH 1,0 mM (5 min), NaOH 0,5 M (5 min) y agua Mili-Q (10 min).
- b) Posteriormente, el capilar se equilibró durante 10 min a 25°C con el tampón de utilizado como electrolito (tampón borato sódico 21 mM, pH 9, conteniendo SDS 11

mM y un 20% (v/v) de acetonitrilo puro), seguido de otros 10 min aplicando un voltaje de 20 kV.

Tras el acondicionamiento del capilar se procedió al análisis de las muestras (patrón y problema). La regeneración de la superficie del capilar entre cada separación se llevó a cabo mediante la incorporación de lavados previos y posteriores al paso de la muestra. Las condiciones de la secuencia completa se detallan a continuación:

- a) Lavados previos: NaOH 0,5 M (2 min), agua Mili-Q (2 min), tampón electrolito (2 min).
- b) Inyección hidrodinámica de la muestra: 0,5 psi durante 5 s.
- c) Migración de la muestra: la separación (a 20°C) se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 28 kV, con polaridad ánodo-cátodo.
- d) La detección fue de tipo directo a 200 y 240 nm. El tiempo de análisis fue de 30 min.
- e) Lavados posteriores: NaOH 0,5 M (2 min), agua Mili-Q (2 min), tampón electrolito (2 min).

La cuantificación de los lignanos se llevó a cabo mediante la interpolación de la respuesta del detector, en cuentas de área, en la correspondiente recta de calibración. Dicha recta fue construida con las concentraciones crecientes de cada lignano

comercial, detalladas anteriormente. Tras la separación de los lignanos presentes en cada muestra, éstas fueron "cebadas" con 2 μL de lignano patrón ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre 60 μL de la muestra problema original, con el fin de confirmar la identidad de cada pico. Este método de confirmación fue acompañado siempre de la comparación con el perfil de separación de los lignanos comerciales. Los resultados son expresados como μg de lignano producidos por cada gramo de tejido inicial utilizado para la extracción.

6-EXTRACCIÓN DE PAs PRODUCIDAS POR LAS TELIOSPORAS DE *S. scitamineum*

Las poliaminas (PAs) fueron extraídas de las diferentes muestras (teliosporas, HMMG o medios de incubación) siguiendo el protocolo descrito por Escribano y Legaz (1988), con ligeras modificaciones, esquematizado en la Figura 24. Todas las centrifugaciones durante el proceso se realizaron en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA).

En primer lugar, muestras de 5 mg de teliosporas previamente hidratadas en agua destilada durante 1 h ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) fueron incubadas en 1,0 mL de glicoproteínas HMMG ($0,16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) procedentes de

plantas inoculadas y no inoculadas de los cv. My 55-14 y B 42231. La incubación se llevó a cabo durante 3 h a temperatura ambiente y en agitación continua ($125 \text{ oscilaciones}\cdot\text{min}^{-1}$). A continuación, una centrifugación (1,0 min a $9.000 \times g$) permitió separar la fracción segregada (contenida en el sobrenadante) de lo que sería la fracción interna (contenida en el precipitado). El precipitado, que daría la fracción interna de PAs, fue macerado con 50 mg de alúmina (Sigma St. Louis, MO, USA) durante 10 min. Además se incorporó una muestra de HMMG (fracción HMMG), para poder cuantificar la cantidad de PAs pre-existentes en las glicoproteínas antes de la incubación, no relacionadas con la secreción activa por parte de las teliosporas.

A continuación, 2 mL de ácido perclórico al 5% (v/v) fueron añadidos tanto a la fracción interna como a la fracción segregada y a la fracción HMMG. Las muestras se incubaron 12 h a 4°C en tubos de plástico con objeto de extraer las PAs. Transcurrido el tiempo, fueron centrifugadas (1,0 min a $9.000 \times g$) durante 20 min a 4°C . Los sobrenadantes (a) contenían las fracciones solubles (la fracción libre soluble en ácido o fracción S, y la fracción conjugada soluble en ácido o fracción SH). Los precipitados (b) contenían la fracción conjugada insoluble en ácido o fracción PH.

Figura 24

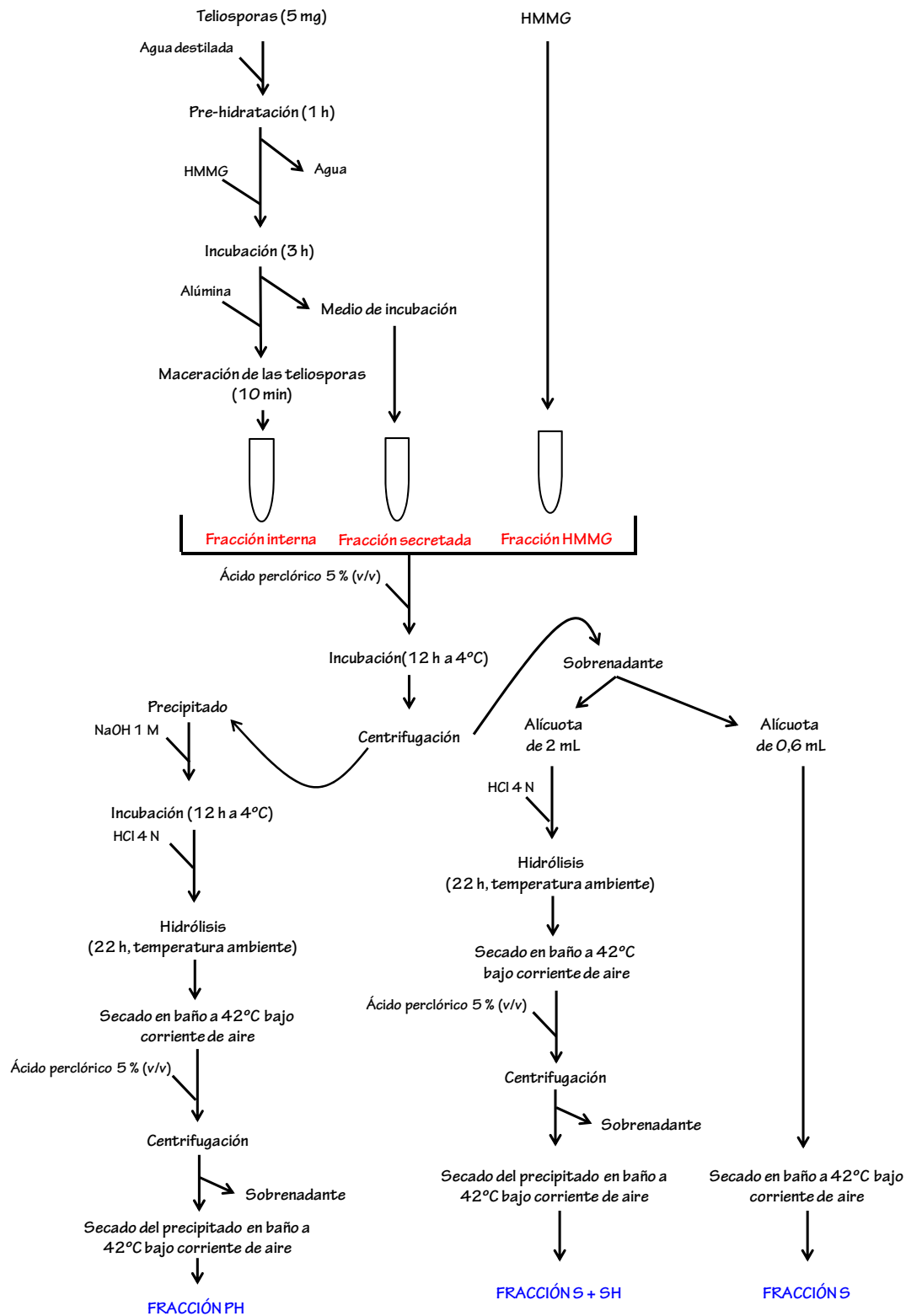


Figura 24. Esquema del protocolo utilizado para la extracción de PAs producidas por las teliosporas de *S. scitamineum*. Metodología detallada en el texto, apartado 6.

-(a) Una alícuota del sobrenadante (600 µL) fue llevada a completa sequedad por calentamiento en un baño a 42°C bajo corriente de aire. El residuo resultante fue denominado *fracción S* de PAs y fue almacenado a -20°C hasta su utilización. Por otro lado, 2 mL del mismo sobrenadante fueron hidrolizados mediante la adición de 2 mL de HCl 4 N. Las mezclas se mantuvieron durante 22 h a temperatura ambiente en oscuridad en tubos herméticos, tras lo cual, fueron llevadas a sequedad.

El residuo seco obtenido fue resuspendido en 2 mL de ácido perclórico al 5% (v/v) y posteriormente centrifugado (1,0 min a 9.000 x g). El sobrenadante obtenido, conteniendo las PAs liberadas por la hidrólisis ácida, fue almacenado a -20°C hasta su utilización. Los niveles de PAs en la *fracción SH* serían los resultantes tras la siguiente diferencia:

$$PA_{(S+SH)} - PA_{(S)} = PA_{(SH)}$$

-(b) Por otro lado, se adicionaron al precipitado de la primera centrifugación (*fracción PH*) 2,5 mL de NaOH 1,0 M. Las muestras fueron incubadas durante 12 h a 4°C en tubos de plástico. A continuación, 2 mL de HCl 4 N fueron añadidos, para llevar a cabo la hidrólisis ácida. La incubación se desarrolló durante 22 h a temperatura ambiente en tubos herméticos. Tras la hidrólisis, las muestras fueron llevadas a sequedad y resuspendidas en 2 mL de ácido

perclórico al 5% (v/v). El ácido fue eliminado por centrifugación (1,0 min a 9.000 x g). Las muestras, secadas de nuevo, fueron almacenadas a -20°C.

Se analizaron las *fracciones S, SH y PH* procedentes de i) las teliosporas (*fracción interna*), ii) las glicoproteínas HMMG (*fracción HMMG*) y iii) las PAs segregadas al medio durante la incubación de las teliosporas en HMMG (*fracción segregada*). Por otro lado, se realizó un control de teliosporas incubadas en agua, valorándose también las *fracciones S, SH y PH* tanto de la *fracción interna* como de la *fracción segregada* al medio.

7-SEPARACIÓN DE PAs POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Las diferentes *fracciones de PAs* producidas por las teliosporas durante su germinación en ausencia o en presencia de HMMG y obtenidas según se describe en el apartado 6 (*Extracción de PAs producidas por las teliosporas de S. scitamineum*) fueron separadas por electroforesis capilar, CE (*Capillary electrophoresis*).

7.1-PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE PAs PARA SU SEPARACIÓN POR CE

Concentraciones crecientes (1,2 µg·mL⁻¹- 0,3 mg·mL⁻¹) de putrescina (PUT),

espermidina (SPD) y espermina (SPM) comerciales (Sigma St. Louis, MO, USA) fueron preparadas en tampón CuSO_4 4 mM conteniendo ácido fórmico 4 mM y éter de corona (18-corona-6) 4 mM, pH 3. Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de $0,45\mu\text{m}$ (Hamilton® Co., Nevada, USA) para ser analizadas por CE bajo las mismas condiciones que las muestras problema, descritas en el apartado 7.3 (*Condiciones para la separación de PAs por CE*).

7.2-PREPARACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE PAs PARA SU SEPARACIÓN POR CE

Las PAs contenidas en las diferentes fracciones, aisladas mediante el protocolo descrito en el apartado 6 (*Extracción de PAs producidas por las teliosporas de S. scitamineum*) fueron resuspendidas en 120 μL del mismo tampón utilizado para disolver los patrones comerciales. Posteriormente, las muestras se filtraron a través de filtros de $0,45\mu\text{m}$ (Hamilton® Co., Nevada, USA). Los patrones comerciales y las diferentes muestras fueron separados mediante CE bajo las condiciones descritas a continuación.

7.3-CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN DE PAs POR CE

Las PAs fueron separadas en un sistema de CE P/ACE™ MDQ Glycoprotein System de

Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), de la misma manera que describe el apartado 5.3 (*Condiciones para la separación de lignanos por CZE*). Previo a su utilización para el paso de la muestra, el capilar fue acondicionado como se describe a continuación:

a) En primer lugar se realizaron tres lavados sucesivos a 60°C , con NaOH 1,0 mM (5 min), NaOH 0,5 M (5 min) y agua Mili-Q (10 min).

b) Posteriormente, el capilar se equilibró durante 10 min a 25°C con el tampón utilizado como electrolito (tampón CuSO_4 4 mM conteniendo ácido fórmico 4 mM y éter de corona (18-corona-6), 4 mM, pH 3), seguido de otros 10 min aplicando un voltaje de 20 kV.

Tras el acondicionamiento del capilar, se procedió al análisis de las muestras (patrón y problema), las cuales fueron sometidas a las condiciones de separación descritas por Arce *et al.*, (1997), con modificaciones. La regeneración de la superficie del capilar entre cada separación se llevó a cabo mediante la incorporación de lavados previos y posteriores al paso de la muestra. Las condiciones de la secuencia completa se detallan a continuación:

a) Lavados previos: HCl 0,4 N (2 min), agua Mili-Q (10 min), NaOH 0,5 M (2 min), agua Mili-Q (2 min), tampón electrolito (15 min).

b) Inyección hidrodinámica de la muestra: 0,5 psi durante 7 s.

c) Migración de la muestra: la separación (a 20°C) se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 12 kV, con polaridad ánodo-cátodo.

d) La detección fue de tipo indirecta a 200 nm. El tiempo de análisis fue de 20 min.

e) Lavados posteriores: NaOH 0,5 M (2 min), agua Mili-Q (2 min), tampón electrolito (2min).

La cuantificación de las PAs se llevó a cabo mediante la interpolación de la respuesta del detector, en cuentas de área, en la correspondiente recta de calibración. Dicha recta fue construida con las concentraciones crecientes de cada PA comercial, detalladas anteriormente. Tras la separación de las PAs presentes en cada muestra, éstas fueron "cebadas" con 2 µL de PA patrón ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) sobre 60 µL de la muestra problema original, con el fin de confirmar la identidad de cada pico. Este método de confirmación fue acompañado siempre de la comparación con el perfil de separación de las PAs comerciales. Los resultados son expresados como µg de poliamina producido por cada mg de espora utilizado.

8-VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

8.1-VALORACIÓN DE ACTIVIDAD UREASA

La valoración de la actividad ureasa en las muestras se llevó a cabo siguiendo el método de microdifusión de Conway (1962), basado en la hidrólisis de la urea en amonio cuantificable, por acción de la ureasa presente en las muestras.

El método se desarrolló en cámaras que contenían dos compartimentos diferenciados: un pocillo interno y un pocillo externo, tal y como ilustra la Figura 25. En el pocillo interno de la placa se añadió 1,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02 N. La mezcla de reacción, que fue añadida a la sección externa de la cámara, estaba formada por 1,5 mL de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9, 0,5 mL de urea 40 mM preparada en tampón fosfato y 1,0 mL de segregado liquénico producido por *E. prunastri* conteniendo, presumiblemente, ureasa. Se prepararon dos réplicas idénticas y en las placas control (también dos) se sustituyó la urea por tampón fosfato sódico 75 mM, pH 6,9. En total, cuatro placas se prepararon por tratamiento, dos placas control y dos de reacción. Las placas fueron selladas herméticamente con silicona filante y las reacciones disparadas secuencialmente por adición del extracto liquénico.

Figura 25

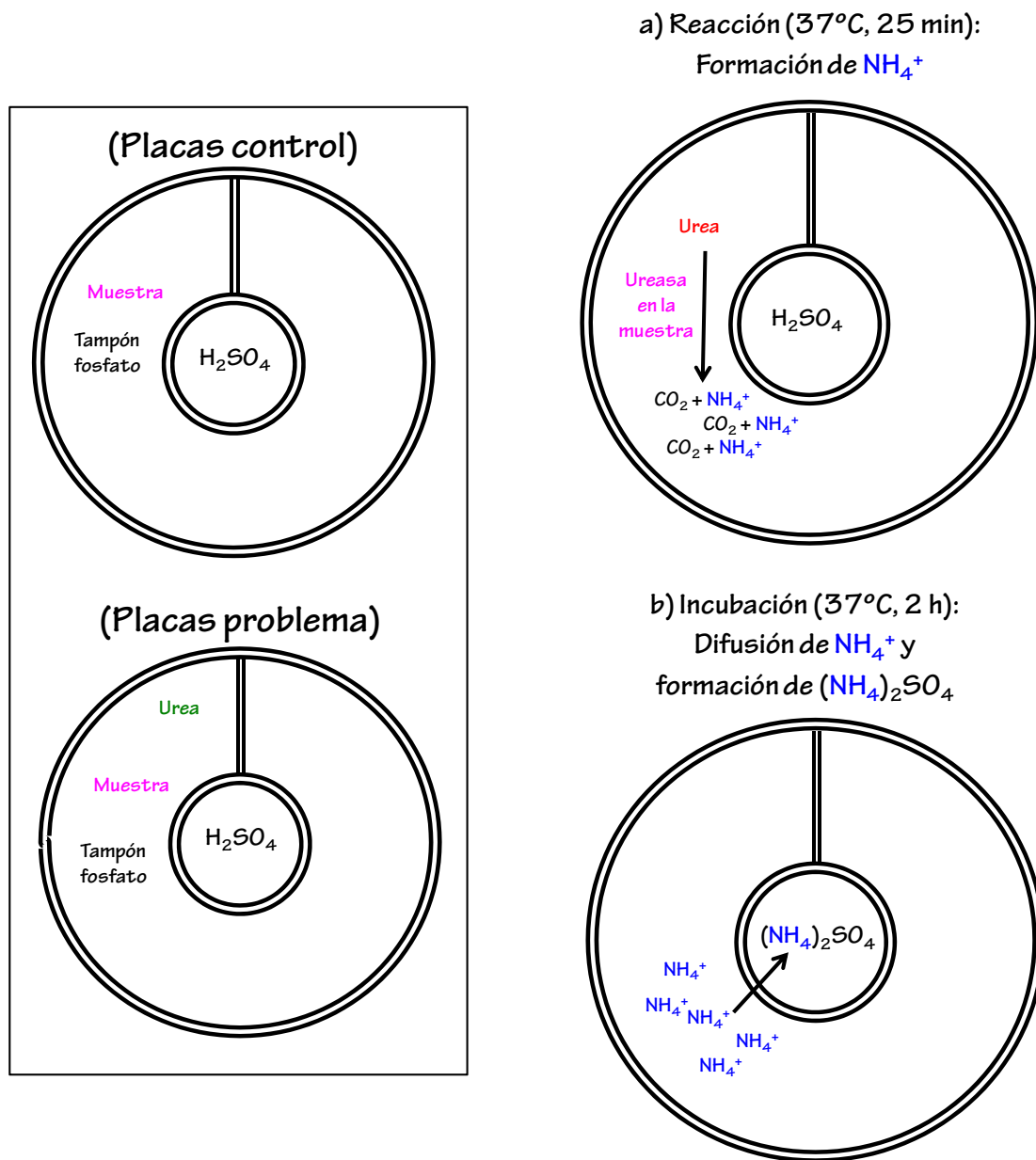


Figura 25. A la izquierda, composición de las placas control y problema. A la derecha, etapas del método de microdifusión de Conway (1962) utilizado para la valoración de la actividad ureasa. Metodología detallada en el texto, apartado 8.1.

Las reacciones fueron llevadas a cabo a 37°C durante 25 min y detenidas, posteriormente, por adición en el pocillo externo de 0,5 mL de una disolución

saturada de carbonato potásico (K_2CO_3). Debido al aislamiento del sistema, el amonio (NH_4^+) formado en el pocillo externo pudo difundir hasta el centro de la placa y quedar

retenido en disolución formando una sal con el ácido sulfúrico. La difusión del NH_4^+ formado durante la reacción hacia el pocillo interno tuvo lugar durante las 2 h siguientes a la adición del K_2CO_3 a 37°C . Trascurrido ese tiempo, se valoró la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ formado en la sección interna de las placas.

La cantidad de amonio formado fue evaluada por espectrofotometría. Los tubos para la valoración contenían 0,5 mL de volumen del pocillo interno, 0,2 mL de agua destilada y 0,3 mL de reactivo de Nessler, el cual vira su coloración de amarilla a parda en presencia de NH_4^+ . La cantidad de NH_4^+ fue valorada a 440 nm frente a un blanco donde la muestra fue sustituida por agua destilada. Los valores de densidad óptica obtenidos fueron interpolados en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La unidad de actividad ureasa fue definida $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

8.2-VALORACIÓN DE ACTIVIDAD ARGINASA

La actividad arginasa fue valorada en las diferentes muestras siguiendo el método de Legaz y Vicente (1982), modificado a partir del método de microdifusión de Conway (1962). En el caso de existir actividad arginasa en las muestras, ésta catalizaría el paso de arginina a urea, que se acoplaría a la

producción de amonio por acción de la ureasa. El proceso se esquematiza en la Figura 26.

Las mezclas de reacción, en el pocillo externo de las placas y en un volumen final de 3 mL, contenían 1,1 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, 0,5 mL de arginina 6 mM, preparada en el mismo tampón Tris-HCl, 1,3 mL de ureasa cristalizada Tipo III (Sigma St. Louis, MO, USA) preparada en tampón Tris-HCl a una concentración de $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 100 μL de ácido maleico- Mn^{2+} y 1,0 mL de muestra. Para la preparación del ácido maleico- Mn^{2+} , se mezclaron 450 mL de ácido maleico 100 mM, pH 9,8, y 25 mL de sulfato de manganeso (MnSO_4) 2 M, enrasándose la muestra hasta un volumen final de 1,0 L. En el pocillo interno de todas las placas se añadió 1,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02 N.

El proceso de formación y difusión del amonio fue llevado a cabo de la misma manera que se detalla en el apartado 8.1 (Valoración de la actividad ureasa), así como su cuantificación por interacción con el reactivo de Nessler. La unidad de actividad arginasa fue definida como $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Figura 26

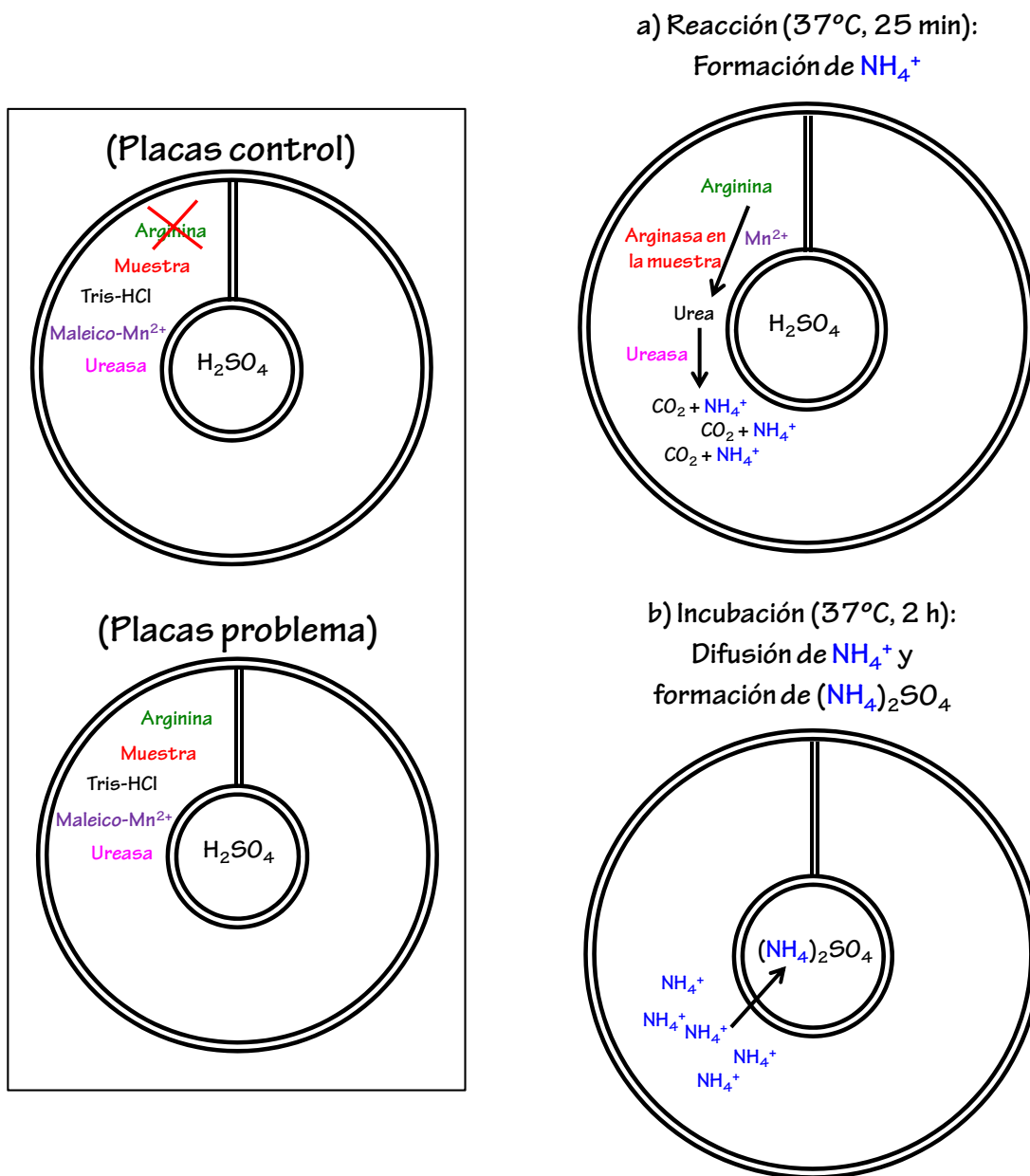


Figura 26. A la izquierda, composición de las placas control y problema en el ensayo para la valoración de la actividad arginasa en las fracciones obtenidas a partir de la semi-purificación de la enzima. A la derecha, etapas del método de Legaz y Vicente (1982), modificado a partir del método de microdifusión de Conway (1962), para la valoración de la actividad arginasa. Metodología detallada en el texto, apartado 8.2.

8.3-VALORACIÓN DE ACTIVIDAD GLUCANASA Y QUITINASA

8.3.1-Valoración en las HMMG antes y después del contacto con las teliosporas

Se comprobó la existencia de actividad degradativa en las glicoproteínas, de manera que ésta pudiera estar relacionada con la pérdida de los efectos quimiotáctico y citoaglutinante durante la interacción planta-patógeno. Las actividades β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa y quitinasa fueron valoradas en el total de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 antes y después del contacto con las teliosporas, como se esquematiza en la Figura 27.

Para la obtención de glicoproteínas HMMG que habían estado incubadas en presencia de teliosporas se siguió el siguiente protocolo:

Se empaquetó 1,0 mg de teliosporas de *S. scitamineum* en una columna de 7,5 cm longitud y 0,5 cm de diámetro interno conteniendo un algodón hidrófilo en el fondo. Las células fueron embebidas en agua destilada durante 1,0 h. El agua fue eliminado, sustituyéndose por 1,0 mL de HMMG (0,41 mg·mL⁻¹). Las glicoproteínas se mantuvieron en contacto con las teliosporas durante 3 h y después la fracción eluída fue recolectada. En ella se valoró la concentración de proteínas

mediante el método de Lowry *et al.* (1951) descrito en el apartado 9 (Valoración de proteínas).

A continuación, las actividades β -1,3-glucanasa, β -1, 4-glucanasa y quitinasa fueron valoradas en la fracción HMMG antes y después de su incubación con las teliosporas, para lo que se siguió el siguiente protocolo:

El ensayo de las actividad β -1,3-glucanasa fue llevado a cabo en mezclas de reacción conteniendo 1,0 mL de laminarina (Sigma St. Louis, MO, USA) preparada al 0,75% (p/v) en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, 0,5 mL de HMMG 0,14 mg·mL⁻¹ y 1,5 mL del mismo tampón fosfato (Santiago *et al.*, 2012b). Se preparó un control, sustituyendo las glicoproteínas por tampón. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 3,5 h a 37°C en agitación continua (125 oscilaciones·min⁻¹). La producción de laminaribiosa fue valorada mediante el método de Sumner (1921), usando ácido dinitrosalicílico como agente oxidante. La actividad β -1,4-glucanasa fue cuantificada de la misma manera, pero en presencia de carboximetil celulosa al 0,75% (p/v) como sustrato, preparada en tampón acetato de sodio /ácido acético 50 mM, pH 5.

Para valorar la actividad quitinasa en el total HMMG, fue utilizada quitina comercial (Sigma St. Louis, MO, USA) como

sustrato de la enzima. Un volumen de 0,2 mL de HMMG ($0,14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) fue incubado con 2 mL de quitina al 0,05% (p/v) en tampón acetato/ácido acético 50 mM, pH 5, a temperatura ambiente. Tras 30 min, la reacción fue detenida por calentamiento de las muestras, a 100°C durante 5 min (Hou

et al., 1998). El incremento en la cantidad de extremos finales reducidos en las moléculas de quitina, lo cual se relaciona directamente con los niveles de actividad de la enzima, fueron determinados por el método de Imoto y Yagishita (1971).

Figura 27

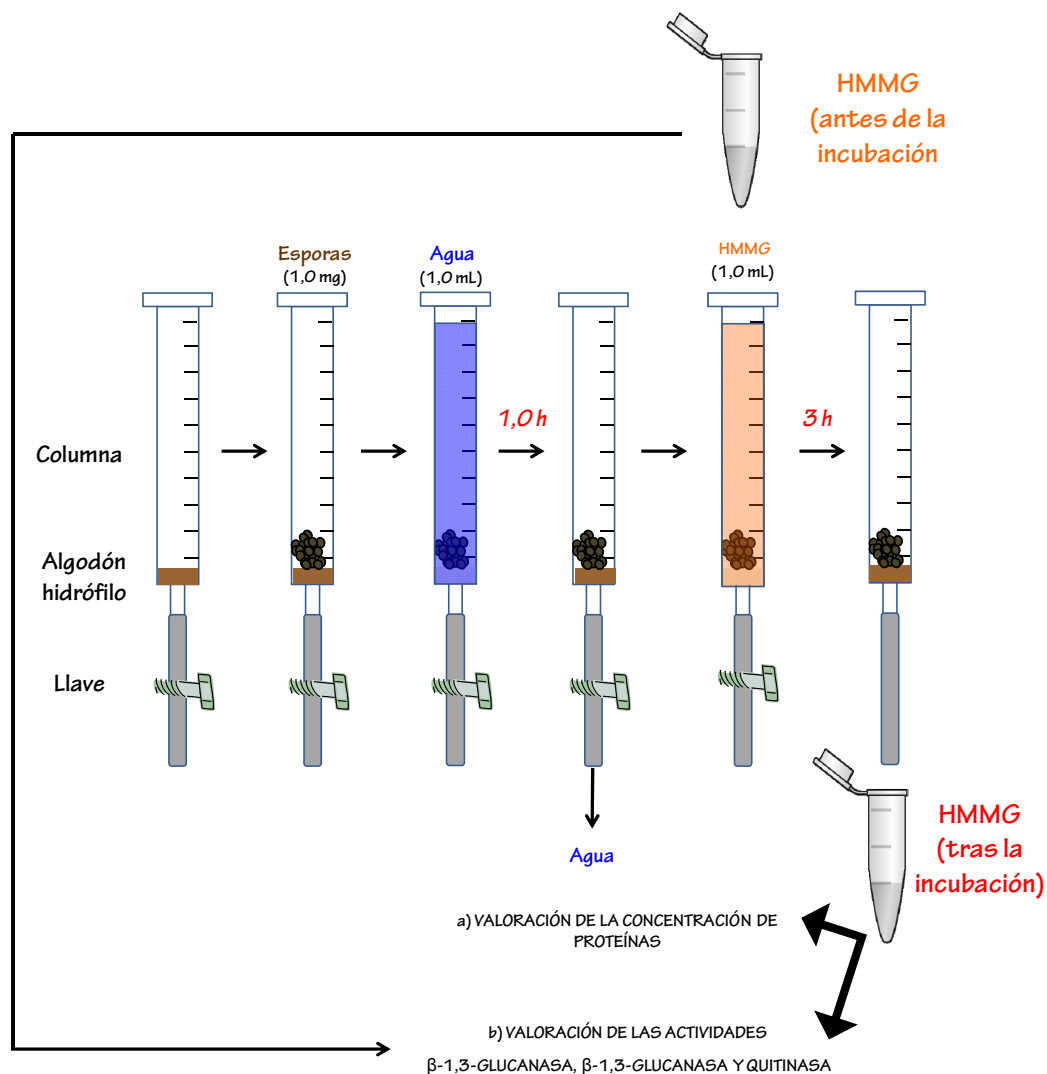


Figura 27. Esquema de la metodología llevada a cabo para la recuperación de glicoproteínas HMMG tras su incubación con teliosporas de *S. scitamineum* durante 3 h. Las actividades β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa y quitinasa fueron valoradas en la fracción HMMG antes y después del contacto con las teliosporas. Metodología detallada en el texto, apartado 8.3.1.

8.3.2- Valoración en las teliosporas antes y después del contacto con las HMMG

Se valoró la existencia de actividades degradativas- β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa y quitinasa- contenidas en las teliosporas y producidas durante las primeras etapas de la germinación, cuando ésta se desarrollaba en ausencia o en presencia de glicoproteínas HMMG.

Para la extracción de la enzima β -1, 3-glucanasa fúngica, 5 mg de teliosporas que habían sido previamente hidratadas en agua destilada durante 1,0 h ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) fueron incubados en presencia de 1,0 mL de agua (control) o 1,0 mL de HMMG ($0,24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) durante 3 h a temperatura ambiente y agitación ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$). A continuación, las muestras fueron centrifugadas en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) a $2.200 \times g$ durante 10 min a 4°C . Los sobrenadantes fueron eliminados y las teliosporas, en el precipitado, fueron incubadas con 1,0 mL de sacarosa 0,1 M preparada en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, durante 15 min. Las células fueron recuperadas de nuevo por centrifugación a $2.200 \times g$ durante 10 min a 4°C . Finalmente, se realizó un lavado de cada muestra con tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,8, el cual se eliminó para resuspender las células en nuevo tampón fosfato (2,5 mL).

El contenido celular de las teliosporas fue liberado por fragmentación mecánica de éstas en presencia de 50 mg alúmina (Sigma St. Louis, MO, USA). Los extractos fueron nuevamente centrifugados a $15.000 \times g$ durante 15 min a 4°C y los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la valoración de proteínas (Lowry *et al.*, 1951), siguiendo el protocolo 9 (Valoración de proteínas) y para el ensayo de la actividad de la enzima β -1, 3-glucanasa, desarrollado en el apartado 8.3.1 (Valoración en las HMMG antes y después del contacto con las teliosporas).

Para la valoración de las actividades β -1,4-glucanasa y quitinasa fúngicas, el método de extracción fue idéntico al descrito para la actividad β -1, 3-glucanasa pero utilizando el tampón acetato sódico/ácido acético 50 mM, pH 5 para una óptima actividad de las enzimas.

9-VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

Para valorar la cantidad de proteínas de las diferentes muestras, se utilizó el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951), mediante el cual se establece una relación proporcional entre la concentración de proteínas y la absorbancia de las muestras tras su incubación en presencia de reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo es reducido en presencia de los

grupos fenólicos de los aminoácidos aromáticos de las proteínas. Así, una mayor cantidad de proteínas en las muestras resultará en un incremento de absorbancia de las mismas a 600 nm, longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del reactivo de Folin reducido.

El patrón utilizado fue albúmina de suero bovino o BSA (*bovine serum albumine*) a una concentración de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para la valoración de la absorbancia en las muestras se utilizó un espectrofotómetro Unicam Helios β (Spectronic Unicam, Cambridge, UK).

10-ENSAYOS DE QUIMIOATRACCIÓN

Los experimentos de quimioatracción se realizaron siguiendo el método de Sjobland *et al.* (1978), con ligeras modificaciones, mediante el cual se analizó el efecto quimiotáctico de distintos agentes sobre la quimiotaxis de las teliosporas de *S. scitamineum*.

El proceso es esquematizado en la Figura 28. Los ensayos se llevaron a cabo en vidrios de reloj, donde se dispusieron 4 mL de agua destilada. A continuación se añadieron en el centro del vidrio de reloj 100 μL de una suspensión de teliosporas previamente hidratadas durante 1,0 h en agua destilada ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Un capilar

conteniendo 20 μL del potencial agente quimioattractante fue situado a 4 mm de la suspensión celular (tocando el fondo del pocillo), con el fin de que las esporas atraídas por el efecto del quimioattractante lograran desplazarse al interior del capilar para ser más tarde contabilizadas. El extremo del capilar que comunicaba con el exterior fue sellado con papel Parafilm M[®] (American Can Co., Neenah, Wis.) M[®].

Figura 28

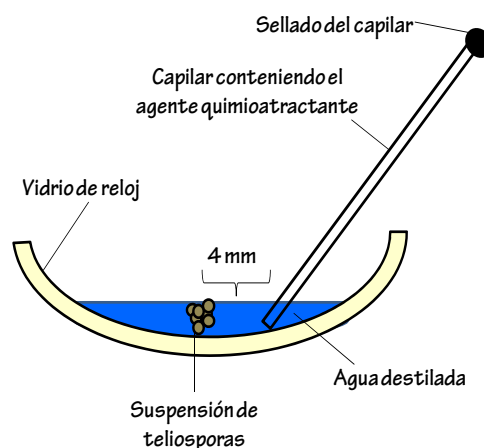


Figura 28: Esquema del método utilizado en el ensayo de la quimiotaxis. Se representa el vidrio de reloj, el capilar conteniendo el agente quimioattractante y las esporas al comienzo del experimento, antes de desplazarse. Metodología detallada en el texto, apartado 10.

Los experimentos se llevaron a cabo bajo distintas condiciones, detalladas todas ellas en la Tabla IV.

Tabla IV

Objetivo	Quimioattractante en el capilar	Agente adicionado al medio de incubación	Controles	Tiempo de incubación
Análisis del efecto quimioattractante de las glicoproteínas (curva dosis-respuesta)	HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	-	Capilar conteniendo tampón fosfato 10 mM, pH 6,8	0-6 h
	MMMGM de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹			
	HMMG de plantas no inoculadas del cv. B 42231 0,41 mg·mL ⁻¹			
	MMMGM de plantas no inoculadas del cv. B 42231 0,41 mg·mL ⁻¹			
Identificación del agente quimioattractante contenido en las glicoproteínas	SCA de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	-	Capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	5 h
	β-1,3-glucanasa comercial 0,41 mg·mL ⁻¹			
	β-1,4-glucanasa comercial 0,41 mg·mL ⁻¹			
	Quitinasa comercial 0,41 mg·mL ⁻¹			
Valoración del efecto quimioattractante de las FP	FP producidas a distintos tiempos de incubación (1,5, 3, 4,5 y 6 h)	-	Capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	5 h
	Arginasas semi-purificadas de las distinta FP (1,5, 3, 4,5 y 6 h)		Capilar conteniendo agua destilada	
Valoración de la implicación de la actina y la miosina en la quimiotaxis por medio de la incubación de las teliosporas en presencia de agentes bloqueantes de la funcionalidad del citoesqueleto	HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	Faloidina [*] (Fal) 0,13 μM	Capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹ , en ausencia de agentes en el medio de incubación	5 h
		Latrunculina A [*] (Lat A) 5 μM		
		Blebistatina [*] (Ble) 13 μM		
	HMMG de plantas no inoculadas del cv. B 42231 0,41 mg·mL ⁻¹	Faloidina [*] (Fal) 0,13 μM	Capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas de B 42231 0,41 mg·mL ⁻¹ , en ausencia de agentes en el medio de incubación	
		Latrunculina A [*] (Lat A) 5 μM		
		Blebistatina [*] (Ble) 13 μM		

Tabla IV. Ensayo de quimiotaxis en relación al quimioattractante utilizado, los agentes adicionados al medio, los controles incluidos para cada ensayo y el tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 10. *Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

**Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).

Tabla IV (continuación)

Objetivo	Quimioattractante en el capilar	Agente adicionado al medio de incubación		Controles	Tiempo de incubación
Análisis de la implicación del citoesqueleto en la quimiotaxis por medio de agentes bloqueantes de la actividad de las GTPasas	HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	LatA 5 µM	-	Capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹ , en ausencia de agentes en el medio de incubación	5 h
			GTP 50 mM		
			GDPβS 5 mM		
			GTPγS 22 mM		
		Fal 0,13 µM + Ble 13 µM	-		
			GTP 50 mM		
			GDPβS 5 mM		
			GTP 50 mM + GTPγS 22 mM		
Valoración de la implicación de los microtúbulos (MT) en la quimiotaxis por medio de la incubación de las teliosporas en presencia de agentes bloqueantes de la funcionalidad del citoesqueleto	HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	Nocodazol ** (Noc) 0,125, 0,5 y 5 µg·mL ⁻¹		Capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹ , en ausencia de agentes en el medio de incubación	5 h

Tabla IV (continuación). Ensayo de quimiotaxis en relación al quimioattractante utilizado, los agentes adicionados al medio, los controles incluidos para cada ensayo y el tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 10. *Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. **Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).

Cada análisis se realizó con su control correspondiente, indicado también en la Tabla IV. Los vidrios de reloj se mantuvieron durante periodos variables de tiempo a 22°C en oscuridad y en atmósfera estática. El número de teliosporas fue contabilizado en cada capilar tras su visualización al

microscopio óptico (ver apartado 12.2 (Microscopía óptica de campo claro)).

Para el registro *in vivo* del desplazamiento de las teliosporas, los ensayos de quimiotaxis fueron repetidos siguiendo el método de Sjobland *et al.* (1978) con modificaciones en presencia de HMMG de plantas My 55-14 no inoculadas

como agente quimioattractante ($0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La secuencia del movimiento celular hacia el capilar fue registrada durante 5 h mediante la captura de imágenes cada 30 s según se describirá en el apartado 12.2 (*Visualización por microscopio invertido*).

11-ENSAYOS DE CITOAGLUTINACIÓN

El efecto citoaglutinante que diferentes agentes ejercen sobre las teliosporas de *S. scitamineum* fue analizado y cuantificado según se detalla a continuación.

Se introdujeron 50 μL del potencial agente citoaglutinante en una gota de 0,5 mL de agua destilada mantenida en un porta-objetos que se encontraba recubierto de papel Parafilm M® (American Can Co., Neenah, Wis.). A continuación, 5 μL de una suspensión de teliosporas previamente hidratadas durante 1,0 h en agua destilada ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) fueron introducidos en la misma gota. Para garantizar que las teliosporas añadidas al experimento no se encontraban aglutinadas, la muestra había sido agitada previamente con la micropipeta. Cada réplica fue preparada directamente sobre la platina del microscopio, de manera que no hubiese modificaciones en la aglutinación debidas al movimiento de los porta-objetos. El proceso se esquematiza en la Figura 29 y en la Tabla

V se especifican los agentes utilizados, los controles incorporados y el tiempo de incubación en los diferentes ensayos de citoaglutinación realizados.

Figura 29

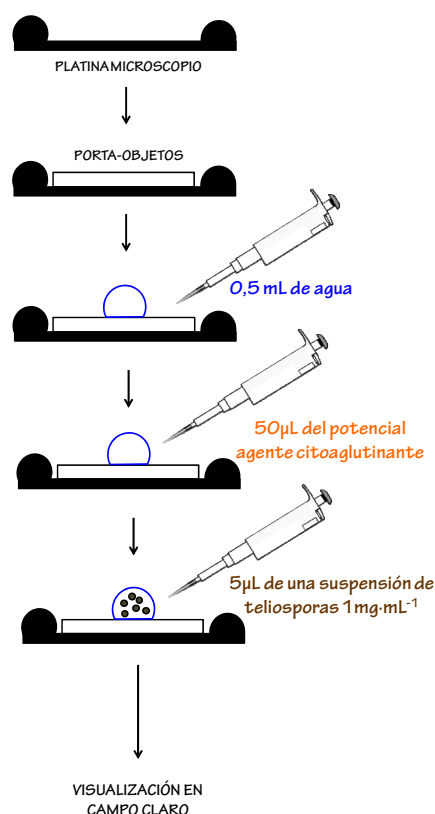


Figura 29. Esquema de la metodología utilizada en los ensayos de citoaglutinación. Metodología detallada en el texto, apartado 11.

Tras la incubación se tomaron tres imágenes (cada una abarcando un área de $0,56 \text{ mm}^2$) mediante microscopio óptico, según se describirá posteriormente en el apartado 12.2 (*Microscopía óptica de campo claro*). En cada imagen se clasificaron las distintas aglutinaciones en relación al número de teliosporas que contenían, como esquematiza la Figura 30.

Tabla V

<i>Objetivo</i>	<i>Agente adicionado al medio de incubación</i>	<i>Controles</i>	<i>Tiempo de incubación</i>
Valoración de los cambios en la citoaglutinación de las teliosporas tras el pico de la quimiotaxis, detectado a las 5 h	HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	-	5 y 6 h
Comparación del efecto citoaglutinante de las HMMG y las arginasas semi-purificadas entre ambos cvs.	HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹	Sustitución del agente por agua destilada	3 h
	SCA de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,41 mg·mL ⁻¹		
	HMMG de plantas no inoculadas de B 42231 0,41 mg·mL ⁻¹		
	SCA de HMMG de plantas no inoculadas de B 42231 0,41 mg·mL ⁻¹		
Valoración del efecto citoaglutinante de las FP	FP 6 h	Sustitución del agente por agua destilada	3 h
	Arginasa semi-purificada de las FP-6h		
Análisis de la implicación de los MT en la citoaglutinación	Noc * 0,5 µg·mL ⁻¹	Sustitución del agente por agua destilada	3 h

Tabla V. Ensayo de citoaglutinación en relación al agente adicionado al medio, los controles incluidos para cada ensayo y el tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 11. *Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).

En función del número total de teliosporas por micrografía (I), el número de células por grupo o talla del grupo (II) y el número de agregados de cada tipo (III) se obtuvo el porcentaje de teliosporas implicado en la formación de las distintas aglutinaciones, según la siguiente fórmula:

$$\text{Teliosporas (\%)} = [(II * III) / I] \cdot 100$$

Un ensayo quimiotáctico en presencia de glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas de My 55-14 fue repetido como se describe en el apartado 10 (*Ensayos de quimioatracción*) para el registro *in vivo* de la formación de aglutinaciones por las células de *S. scitamineum*. La visualización se realizó mediante microscopio invertido (*ver*

apartado 12.2 (Visualización por microscopio invertido)), tomándose imágenes cada 30 s.

Figura 30

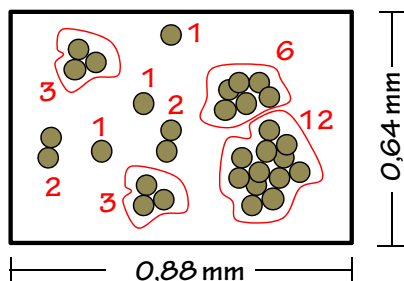


Figura 30. Representación esquemática del procesamiento de una imagen obtenida por microscopía óptica para la valoración del nivel de aglutinación. Las agrupaciones se clasificaron según el número de células que contenían, cuantificándose el número de agregados que existían de cada tipo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de teliosporas implicado en la formación de cada tipo de agregado.

12- ANÁLISIS POR MICROSCOPIA

12.1-MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

12.1.1-Ensayos con proteínas marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

12.1.1.1-Ligamiento y desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas

Se realizaron ensayos de unión de la Con A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

marcada con FITC a la pared de las teliosporas. Posteriormente, se analizó el poder de desorción de metil manosa y de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas e inoculadas de My 55-14 sobre la Con A ligada a la pared celular.

En primer lugar, se incubó 1,0 mL de Con A ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en presencia de 0,1 mL de FITC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) preparado a una concentración de $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en tampón Tris-HCl, pH 9. La incubación fue llevada a cabo durante 2 h a 30°C en oscuridad y agitación constante ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$). A continuación, la muestra fue dializada en presencia de 2 L de tampón Tris HCl, pH 9, durante 24 h a 4°C , en oscuridad y agitación constante ($300 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$). La fluorescencia en el volumen dializado, conteniendo las macromoléculas marcadas, fue cuantificada usando un espectrofluorímetro Kontron SF25 (Kontron Instruments AG, Zurich, Switzerland), utilizando bandas de excitación y emisión de 490 y 517 nm, respectivamente y posteriormente ensayada para su unión a la superficie de las teliosporas (Molina y Vicente, 1995).

Para ello, se incubó 1,0 mg de esporas que habían sido previamente hidratadas en agua destilada durante 1 h ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en presencia de 250 μL de una concentración $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Con A marcada con FITC. La incubación se desarrolló a 30°C durante 2 h

en agitación ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$) y oscuridad. A continuación las muestras fueron centrifugadas a $9.200 \times g$ durante 10 min a 4°C en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) y la fluorescencia en el sobrenadante fue valorada de nuevo por espectrofluorimetría.

Conociendo los valores iniciales de fluorescencia (I) de las proteínas marcadas y la cantidad de fluorescencia en el sobrenadante tras la incubación (fluorescencia no ligada, II), se calculó el porcentaje de fluorescencia que había quedado retenida en la pared celular, según la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia retenida (\%)} = [(I - II) / I] \cdot 100$$

Tras varios lavados para eliminar la fluorescencia residual no ligada a la pared de las teliosporas, las células, conteniendo en su pared la Con A marcada, fueron incubadas en presencia de $300 \mu\text{L}$ de a) metil-manosa 100 mM, b) glicoproteínas HMMG procedentes de plantas no inoculadas del cv. My 44-15 o c) glicoproteínas HMMG procedentes de plantas inoculadas del mismo cv. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 1,0 h, en agitación ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$) y oscuridad, según el protocolo de Legaz *et al.* (2004). Las muestras fueron centrifugadas a $9.200 \times g$ durante 10 min y la fluorescencia desorbida tras la incubación fue cuantificada en los sobrenadantes (III). Se calculó entonces el

porcentaje de fluorescencia desorbida para cada tratamiento, según la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia desorbida (\%)} = [III / (I - II)] \cdot 100$$

Fueron tomadas imágenes que mostraban la unión de las proteínas marcadas sobre la superficie celular (antes y después de la desorción) mediante microscopía óptica de fluorescencia para los diferentes tiempos de incubación. Se hizo por medio de un microscopio de fluorescencia BX51 unido a una cámara refrigerada DP72 y una lámpara de mercurio U-RFL-T, los tres de Olympus (Center Valley, PA, CA, USA). Para la visualización de la fluorescencia fue utilizado un filtro de excitación de 465 nm. Las imágenes fueron analizadas usando el programa de adquisición de imágenes Cell A (Amnis Corporation, Seattle, WA, USA).

12.1.1.2-Ligamiento de HMMG-FITC a la pared de las teliosporas

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.1.1.1 (Ligamiento y desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas), la fluorescencia en el sobrenadante tras la incubación de teliosporas en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. resistente marcadas con FITC ($0,41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) fue valorada tras distintos de incubación (0-6 h). Por otro lado y siguiendo el mismo

protocolo, fueron obtenidas imágenes de teliosporas marcadas con HMMG-FITC.

12.1.1.3-Ligamiento y desorción de AFA, IFA y SCA a la pared de las teliosporas

Experimentos de ligamiento y desorción de las distintas arginasas (AFA, IFA y SCA) a su receptor en la pared de las teliosporas fueron realizados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.1.1.1 (*Ligamiento y desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas*). El proceso completo se esquematiza en la Figura 31.

En primer lugar, la SCA de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14, así como las FP conteniendo AFA o IFA (las tres a una concentración de $0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), fueron marcadas con FITC, cuantificándose el nivel inicial de fluorescencia en cada caso. A continuación, $1,0 \text{ mg}$ en peso seco de esporas pre-hidratadas fue incubado en presencia de $500 \text{ }\mu\text{L}$ de SCA, AFA o IFA marcadas con FITC a una concentración $0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para su unión a la superficie celular. Tras la incubación, se calculó el porcentaje de fluorescencia retenida sobre la superficie celular en cada tratamiento y se tomaron imágenes del marcaje celular con FITC mediante microscopía óptica de fluorescencia. Se cuantificó el número de células que presentaban marcaje en la

superficie celular en un total de 20 fotografías por tratamiento.

Tras varios lavados para eliminar la fluorescencia residual no ligada a la pared de las teliosporas, las células, conteniendo en su pared cada uno de los tres tipos de proteína marcada, fueron incubadas en presencia de $500 \text{ }\mu\text{L}$ ($0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de cada una de las otras dos proteínas (éstas, sin marcar) con el fin de analizar el poder de desorción que cada una de las proteínas ejercía sobre las otras dos, tal y como esquematiza la Figura 31. Se tomaron fotografías del marcaje de las teliosporas también tras la desorción, y se calculó el porcentaje de fluorescencia desorbida para cada tratamiento.

12.1.1.4-Diferencias en el patrón de unión de AFA e IFA a la pared celular

Se resuspendió $1,0 \text{ mg}$ de teliosporas, previamente hidratadas durante $1,0 \text{ h}$ en agua destilada ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en $1,0 \text{ mL}$ ($0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de AFA o IFA marcadas con FITC. Las muestras fueron incubadas hasta 96 h a 25°C en presencia de estreptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) $50 \text{ }\mu\text{M}$ para evitar contaminaciones bacterianas. Se tomaron imágenes mediante microscopía óptica de fluorescencia, de igual manera que se detalla en el apartado 12.1.1.1 (*Ligamiento y*

desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas).

Figura 31

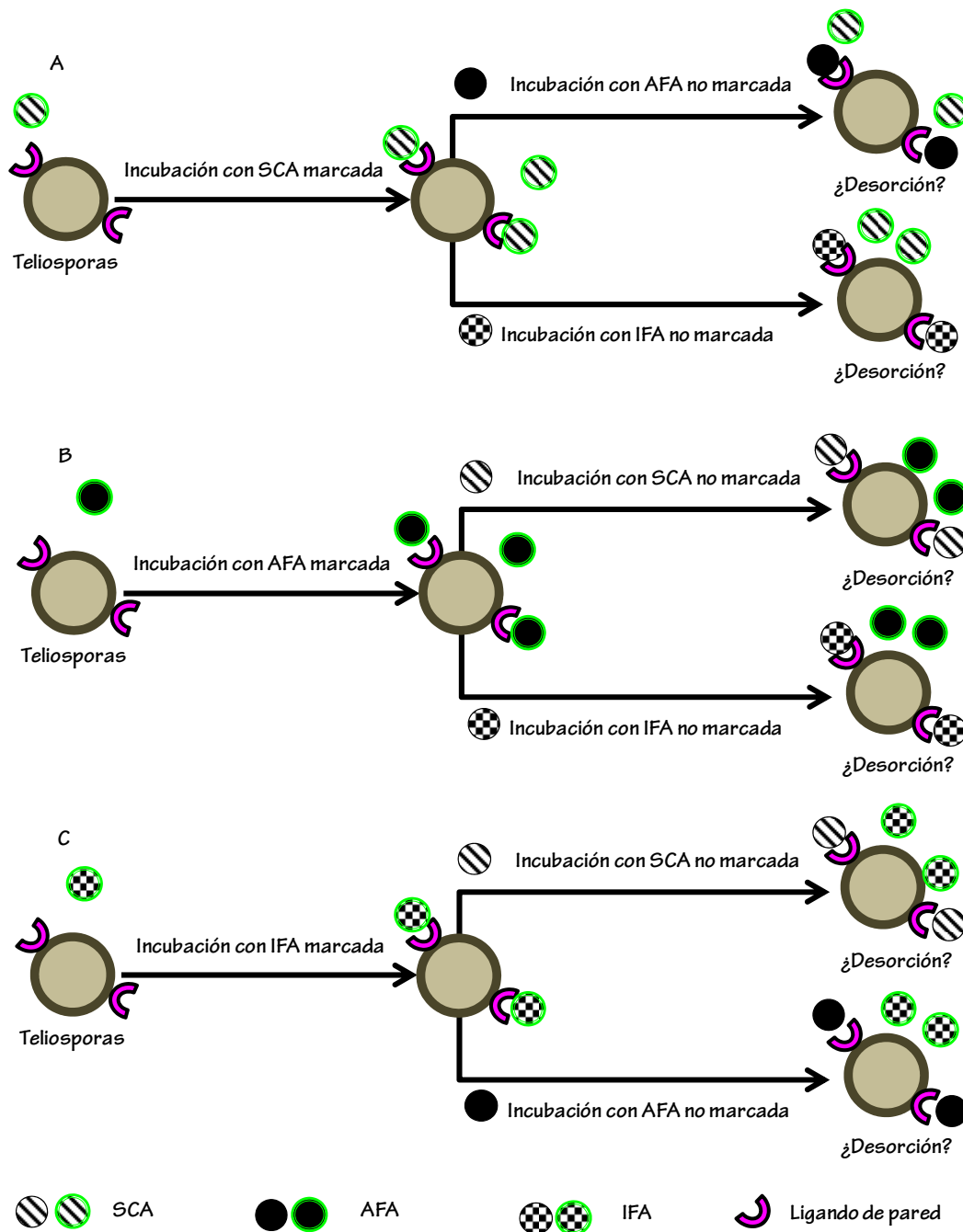


Figura 31. Esquema del protocolo del experimento de desorción de las proteínas SCA, AFA e IFA fluorescentes (en verde) tras su unión a la superficie de las teliospora en presencia de las mismas proteínas sin marcar. Metodología detallada en el texto, apartado 12.1.1.3.

12.1.1.5-Polarización de la actina en presencia de nocodazol (Noc)

Se incubaron 0,1 mg de esporas pre-hidratadas en agua destilada durante 1,0 h ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en presencia de Noc $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o en presencia de agua destilada durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, el volumen de incubación fue eliminado por centrifugación (1,0 min a $9.000 \times g$) en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA).

El marcaje de la F-actina en las células se realizó en presencia de Fal conjugada a Alexa Fluor® 488 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Para ello, se siguió el protocolo detallado en el apartado 12.4.1 (*Localización de actina y miosina en las teliosporas de S. scitamineum en ausencia y en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14*) sin adicionar en este caso ningún anticuerpo.

Las muestras fueron visualizadas por microscopía óptica de fluorescencia según describe el apartado 12.1.1.1 (*Ligamiento y desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas*). Se tomaron 50 células por tratamiento. El porcentaje de células que presentaban un marcaje asimétrico (o polarizado) de la actina fue cuantificado en ausencia y en presencia de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Noc.

12.1.2-Marcaje nuclear con DAPI

12.1.2.1-Alteraciones nucleares en teliosporas incubadas en PUT y SPD

Se pre-hidrataron 0,25 mg de teliosporas en agua destilada durante 1,0 h ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se incubaron 100 μL de la suspensión en presencia de concentraciones crecientes de PUT y SPD (0,1-10 mM) en un volumen final de 500 μL durante 15 h en agitación. Un control, incubado en ausencia de PAs fue incorporado al ensayo.

A continuación, el medio de incubación (agua o disolución de PAs, en cada caso) fue eliminado y 50 μL de formaldehído fueron añadidos a cada muestra, para la fijación (10 min), tras lo cual, las muestras fueron lavadas con 100 μL de agua destilada durante 10 min para eliminar el exceso de formaldehído.

Para facilitar la entrada del marcador fluorescente, las células fueron incubadas en 100 μL de polivinilpirrolidona (PVP) al 7% (p/v) durante 10 min en agitación. Sin eliminar el PVP, las teliosporas fueron incubadas en presencia de 4,6-diamino-2-fenilindol, DAPI, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) $7,5 \mu\text{M}$ durante 10 min, en oscuridad y agitación ($125 \text{ oscilaciones}\cdot\text{min}^{-1}$). El DAPI y el PVP fueron retirados por centrifugación de las muestras durante 1,0 min a $9.000 \times g$ en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St.

Louis, MO, USA). El montaje de las preparaciones se llevó a cabo en un portaobjetos con una gota de Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) con DABCO (1,4-diazobiciclo(2,2,2) octano) al 0,6 % (p/v).

La fluorescencia de las muestras se examinó con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 conectado a una Cámara Digital Olympus DP70 (Olympus Co., Ltd., Tokyo, Japón) y fue analizada mediante el uso del programa para el procesado de las imágenes DP Controller (Olympus). Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 405 nm y 461 nm, respectivamente. El marcaje fluorescente correspondía a regiones nucleares, ya que el DAPI forma complejos específicos con secuencias ricas en adenina y timina contenidas en el ADN (Williamson y Fennell, 1974).

12.1.2.2-Alteraciones nucleares en esporidios aislados (+) tratados con lignanos comerciales

Muestras de esporidios aislados (+), a concentración $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹, fueron incubadas durante 3 h en agua destilada conteniendo concentraciones crecientes (5-40 µg·mL⁻¹) de una mezcla de lignanos comerciales (pinoresinol, lariciresinol, isolariciresinol, matairesinol y secoisolariciresinol), todos a la misma

proporción y obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Transcurridas las 3 h de incubación, se siguió el protocolo descrito en el apartado (12.1.2.1 *Alteraciones nucleares en teliosporas incubadas en PUT Y SPD*) para la visualización de la organización nuclear en los esporidios tras el tratamiento con las distintas concentraciones de la mezcla de lignanos comerciales.

12.2-MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO

Los resultados tras los ensayos de quimiotaxis, citoaglutinación o germinación fueron visualizados en un microscopio óptico Olympus BX51 conectado a una Cámara Digital Olympus DP72 (Center Valley, PA, CA, USA) para la toma de fotografías. Éstas fueron obtenidas usando el programa de adquisición de imágenes Cell A (Amnis Corporation, Seattle, WA, USA).

12.3- MICROSCOPIO INVERTIDO

Los procesos de desplazamiento celular y citoaglutinación *in vivo* fueron observados en un invertoscopio Zeiss 60 (Zeiss, Germany) unido a una cámara CCD.

12.4-MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL

12.4.1-Localización de actina y miosina en las teliosporas de *S. scitamineum* en ausencia y en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14

Se construyó una cámara de humedad utilizando para ello una placa de Petri de 20 cm de diámetro sellada con papel Parafilm M® (American Can Co., Neenah, Wis.) M® que poseía en su interior una oblea de papel de filtro empapado en agua destilada. Se introdujeron 10 cubre-objetos en la cámara de humedad sobre los que se colocaron 30 µL de polilisina 1,0 µM. Estos cubre-objetos se mantuvieron en la cámara de humedad durante 8 h, tras las cuales se retiró la polilisina no fijada al sustrato.

Se incubó 1,0 mg de teliosporas que habían sido previamente hidratadas en agua destilada durante 1,0 h ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) con glicoproteínas HMMG ($0,41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) procedentes de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 en ausencia (control) o en presencia de Lat A 5 µM, Fal 0,13 µM o Ble 13 µM. La incubación se llevó a cabo durante 3 h a temperatura ambiente.

Tras las 3 h de incubación, 20 µL de cada muestra se colocaron sobre los cubre-objetos ya cubiertos de polilisina (por duplicado). Transcurridas 2 horas se retiró la suspensión de células no fijada y posteriormente se añadieron 30 µL de

formaldehído durante 10 min, eliminándose de nuevo los restos no fijados. Se realizó un lavado con 100 µL de tampón fosfato sódico o PBS 10 mM, pH 6,7, durante 5 min y se depositaron 30 µL de glutaraldehído sobre las muestras fijadas, manteniéndolas en contacto durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo el glutaraldehído se retiró y las preparaciones fueron lavadas tres veces con tampón PBS (5 min cada lavado).

A continuación, las muestras fueron permeabilizadas con PVP al 7% (p/v) durante 1,0 h. Sin eliminar el PVP, se añadieron 50 µL del anticuerpo anti-fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA) diluido 1:500 en PBS conteniendo 0,1% de saponina (v/v). La incubación se mantuvo durante 2 h a 37°C, tras lo cual se realizaron 3 lavados con tampón PBS de 5 min de duración cada uno. Entonces las muestras fueron incubadas en presencia de 50 µL del anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) y diluido 1:500 en PBS conteniendo 0,1% de saponina (v/v). Al mismo tiempo se añadieron 30 µL de Fal conjugada a Alexa Fluor® 488 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Transcurrida 1,0 h en oscuridad, se procedió a eliminar el exceso de Fal y anticuerpo mediante lavados sucesivos con PBS (3 lavados, de 5 min cada uno).

El montaje de las preparaciones se llevó a cabo en un porta-objetos con una gota de Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) con DABCO al 0,6% (p/v) para evitar el decaimiento de la fluorescencia. Las preparaciones se mantuvieron a 4°C en oscuridad durante 12 h hasta su visualización.

Las imágenes de microscopía confocal fueron registradas por medio de una cámara Leica DFC 350 FX (Leica lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptada a un invertoscopio Leica DMI-6000 (Stuttgart, Alemania). Las bandas de excitación y emisión utilizadas fueron de 468 y 520–540 nm, respectivamente. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa Leica Confocal.

La distribución de la actina en las células fue valorada a partir de las micrografías obtenidas mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, US) en función de los siguientes parámetros: i) número de células que presentaban una distribución asimétrica de la fluorescencia, ii) fluorescencia media de las células por pixel, iii) las diferencias entre el valor mínimo y máximo de fluorescencia en las células, iv) fluorescencia total por célula. Se analizó un total de cincuenta células por tratamiento y se presentan los resultados correspondientes a la media de los diferentes resultados obtenidos.

12.4.2-Localización actínica y nuclear en las teliosporas de *S. scitamineum* durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.

Durante la estancia de investigación en el Departamento de Biología Celular Vegetal del Instituto de Botánica Celular y Molecular de Bonn (Alemania) se realizaron experimentos para la localización simultánea de la F-actina y el material nuclear en las teliosporas, de nuevo mediante microscopía confocal. Al realizarse en otro centro de investigación, el protocolo seguido fue diferente al ya descrito para la localización de la actina y la miosina en el apartado 12.4.1 (*Localización de actina y miosina en las teliosporas de S. scitamineum en ausencia y en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14*).

Se incubaron 0,5 mg de esporas pre-hidratadas durante 2 h en agua destilada (1,0 mg·mL⁻¹) en presencia de a) Jasplakinolida, Jas, (Calbiochem, Bad Soden, Germany) 5 µM, b) Jas 10 µM, c) agua destilada, d) HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14, e) HMMG de plantas inoculadas de My 55-14, f) HMMG de plantas no inoculadas de B 42231 o f) HMMG de plantas inoculadas de B 42231. Transcurridas 3 h, los medios de incubación fueron eliminados y el marcaje de la actina en las células fue llevado a cabo siguiendo el

protocolo de Baluska *et al.* (1992), con modificaciones, según se describe a continuación. Todos los volúmenes desechados durante el proceso se eliminaron por centrifugación en una microcentrifuga Capsule HF-120 (Tomy Seiko, Tokyo, Japan) para centrifugaciones cortas o *spins*.

Para la fijación fueron añadidos 500 μ L de disolución de fijación conteniendo un 1,5% de paraformaldehído (v/v) y un 0,5% de glutaraldehído (v/v), preparada en tampón estabilizante de microtúbulos o MTSB (*Microtubule Stabilizing Buffer*), pH 7,3. El tampón MTSB estaba compuesto por 100 mM de tampón PIPES (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 5 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mM de KCl, 10 mM de EGTA y 1,0% (v/v) de dimetil sulfóxido, DMSO. La fijación fue llevada a cabo a vacío, durante 20 min. A continuación, la disolución de fijación fue eliminada, y las muestras fueron lavadas en tampón PBS durante 10 min.

Para la reducción, las teliosporas fueron incubadas en tampón PBS 10 mM, pH 7,3, conteniendo 500 μ L de $NaBH_4$ (1,0 $mg \cdot mL^{-1}$) durante 15 min, y a continuación lavadas con MTSB (2 lavados de 5 min) y tampón PBS (un lavado de 5 min).

A continuación, las teliosporas fueron permeabilizadas durante 1,0 h en agitación y temperatura ambiente en 500 μ L de MTSB conteniendo glicina 50 mM, Tritón X-

100 al 1,0% (v/v) y DMSO al 2% (v/v). La disolución de permeabilización fue eliminada y las células fueron incubadas en 500 μ L de disolución bloqueante, consistente en gelatina de pez al 1,0% (p/v) preparada en tampón PBS, durante 1,0 h a temperatura ambiente en fuerte agitación (125 oscilaciones $\cdot min^{-1}$). La disolución de bloqueo fue, a su vez, eliminada.

Para la unión del anticuerpo primario, las teliosporas fueron incubadas a 37°C durante 2 h en presencia de un anticuerpo policlonal anti-actina de maíz obtenido de Christopher J. Staiger (Purdue University, IN, USA) y producido en conejo, diluido 1:200 en albúmina de suero bovino (BSA) preparada al 2% (p/v) en tampón PBS. El exceso de anticuerpo fue eliminado por lavado de las muestras en tampón PBS (4 lavados de 15 min cada uno). El anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo anti-Inmunoglobulina G (IgG) de conejo, conjugado a Alexa Fluor® 488 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) y diluido 1:200 en BSA preparada al 2% (p/v) en tampón PBS. De nuevo, las muestras fueron lavadas 4 veces en tampón PBS. Para la localización nuclear, las teliosporas fueron incubadas durante 10 min en agitación (125 oscilaciones $\cdot min^{-1}$) y oscuridad en presencia de DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 5 μ M. Tras la incubación, fueron lavadas en tampón PBS durante 15 min.

Las muestras fueron montadas en un porta-objetos embebido en solución de montaje (90% de glicerina conteniendo 10 mg·mL⁻¹ de p-fenilendiamina, preparada en PBS, a pH 8) para mantener inalterada la fluorescencia en las células hasta su visualización.

Finalmente, la fluorescencia en las células fue analizada utilizando un microscopio confocal Olympus FluoView FV-1000 (Olympus FluoView, Germany) equipado con el programa 4.0 Fluoview para el análisis de las imágenes. Para la visualización de la actina, fueron utilizadas las líneas de excitación y emisión de 488 nm y 520 nm, respectivamente. Las líneas de excitación y emisión utilizadas para la visualización de la tinción nuclear fueron las de 405 y 461 nm. Las proyecciones en el eje Z fueron obtenidas por superposición de 15-30 imágenes obtenidas en serie y correspondientes a secciones ópticas de 0,4-0,6 µm.

12.4.3-Marcaje nuclear *in vivo* de células tratadas con HMMG

Se incubaron 0,3 mg de esporas previamente hidratadas en agua destilada durante 1,0 h (1,0 mg·mL⁻¹) con 300 µL de glicoproteínas HMMG (0,5 mg·mL⁻¹) producidas por plantas inoculadas y no inoculadas de los cv. My 55-14 y B 42231. La incubación tuvo lugar durante 9 h en

agitación (125 oscilaciones·min⁻¹) a temperatura ambiente. Un control, incubado en agua, fue incorporado en el experimento.

Tras 9 h, el volumen de incubación fue eliminado y las muestras fueron mantenidas en presencia de 300 µL de PVP al 7% durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 µL de DAPI 10 µM. Las teliosporas fueron entonces incubadas durante 10 min a temperatura ambiente en agitación (125 oscilaciones·min⁻¹) y oscuridad. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y depositada en un porta-objetos. La fluorescencia nuclear fue visualizada inmediatamente por microscopía confocal, como describe el apartado 12.4.2 (*Localización actínica y nuclear en las teliosporas de S. scitamineum durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.*).

12.4.4-Localización microtubular y nuclear en las teliosporas de *S. scitamineum* durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.

La confirmación de la existencia de un esqueleto microtubular en el interior de las teliosporas del carbón fue llevada a cabo por inmunomarcaje de la tubulina mediante anticuerpos específicos fluorescentes. De esta manera, la arquitectura microtubular podría ser posteriormente visualizada mediante microscopía confocal. La

organización microtubular en las células debía ser diferente cuando éstas eran incubadas en presencia de agentes polimerizantes o despolimerizantes del citoesqueleto de tubulina. Por ello, el marcaje también se hizo sobre células que habían sido previamente incubadas con taxol, un fuerte agente polimerizante de los MT (Schiff *et al.*, 1979), para observar diferencias en el marcaje con células no incubadas con el inhibidor.

Esporas (0,5 mg) pre-hidratadas en agua destilada ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) durante 1, 0 h fueron incubadas durante 3 h con taxol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) $10 \text{ } \mu\text{M}$, con $300 \text{ } \mu\text{L}$ de glicoproteínas HMMG ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) producidas por plantas inoculadas y no inoculadas de los cv. My 55-14 y B 42231 o con agua destilada (control). Tras las 3 h, el medio de incubación fue descartado, y se procedió al marcaje microtubular y nuclear en las células tratadas siguiendo el protocolo de Baluska *et al.* (1992) con modificaciones, descrito en el apartado 12.4.2 (*Localización actínica y nuclear en las teliosporas de S. scitamineum durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.*).

Para la unión del anticuerpo primario, las teliosporas fueron incubadas a 37°C durante 2 h en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-tubulina (clon tub-1A2, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA),

diluido 1:200 en albúmina de suero bovino (BSA) preparada al 2% (p/v) en tampón PBS. El anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo anti-Inmunoglobulina G (IgG) de conejo, conjugado a Alexa Fluor® 488 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) y diluido 1:200 en albúmina de suero bovino (BSA) preparada al 2% (p/v) en tampón PBS.

La fluorescencia de los MT en las teliosporas control, incubadas con taxol o tratadas con HMMG fue observada utilizando un microscopio confocal Olympus FluoView FV-1000 (Olympus FluoView, Germany) equipado con el programa 4.0 Fluoview para el análisis de las imágenes. Fueron utilizadas las longitudes de onda de excitación y emisión de 488 nm y 520 nm, respectivamente. Las líneas de excitación y emisión utilizadas para la visualización de la tinción nuclear fueron las de 405 y 461 nm. Las proyecciones en el eje Z fueron obtenidas por superposición de 15–20 imágenes obtenidas en serie y correspondientes a secciones ópticas de 0,4–0,6 μm .

Los efectos de las glicoproteínas HMMG sobre la organización microtubular de las células fúngicas fueron evaluados a partir de las fotografías obtenidas (50 por tratamiento) en función de los siguientes resultados:

- El porcentaje de células que presentaban una distribución asimétrica de la fluorescencia microtubular (polarización microtubular).

- El área de ocupación del núcleo (I) en relación al total de área de la teliospora (II) permitió calcular el porcentaje de área celular ocupada por el núcleo (área nuclear). Se utilizó para ello la siguiente fórmula:

$$\text{Área nuclear (\%)} = (I/II) \cdot 100$$

Las medidas se hicieron por medio del programa ImageJ (National Institutes of Health, US)

- El porcentaje de células que presentaban un núcleo fragmentado (total o parcialmente) o un núcleo no fragmentado.

12.5-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

12.5.1-Análisis por microscopía electrónica de transmisión,TEM (Transmission Electron Microscopy)

El ensayo de quimiotaxis de las teliosporas fue repetido siguiendo el método de Sjobland *et al.* (1978), como se describe en el apartado 10 (*Ensayos de quimioatracción*), en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas My 55-14 no inoculadas como agente quimioattractante ($0,41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

El contenido del capilar fue depositado en un tubo eppendorf y las

células fueron permeabilizadas con 1,0 mL de PVP al 7% (p/v). A continuación se sometieron a centrifugación en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) a 4°C y $12.000 \times g$ durante 10 min, eliminándose el sobrenadante resultante y siguiendo el protocolo con el producto del precipitado y siempre dentro de los tubos eppendorf.

La fijación fue llevada a cabo durante 6 h a 4°C , utilizándose glutaraldehído al 2,5% (v/v) preparado en tampón fosfato sódico-Milloning, pH 7,3 (Milloning, 1961) para la fijación de las estructuras proteicas. Transcurridas las 6 h de la fijación, se realizaron 4 lavados con tampón Milloning pH 7,3 a temperatura ambiente, manteniéndose las muestras en el mismo tampón 12 h a 4°C . La post-fijación se realizó durante 2 h a temperatura ambiente en presencia de tetróxido de osmio al 1,0% (v/v) combinado con ferricianuro potásico al 3% (v/v) en proporción 1:1 (2 mL de tetróxido de osmio + 2 mL de ferricianuro potásico), para la fijación de las estructuras lipídicas. Se realizaron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar el exceso de reactivo.

El proceso de deshidratación se llevó a cabo embebiendo la muestra en concentraciones crecientes de acetona, 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100% (v/v), realizando dos cambios por disolución nueva

cada 30 min. Para llevar a cabo la inclusión, las células fueron embebidas en resinas Epon-812 siguiendo las proporciones indicadas en la Tabla VI.

Finalmente, la resina polimerizó en 48 h a 70°C. A continuación se realizaron cortes semi-finos (0,35-0,5 μm) y ultra-finos (70-90 nm) con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo (OmU2-Reichert Jung). Se depositaron en rejillas de cobre cubiertas por pioloformo y se tiñeron con acetato de uracilo al 2% (v/v) y citrato de plomo al 0,4% (p/v) (Reynolds, 1963) en una placa de Petri para impedir la exposición al aire y lavándose posteriormente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Los cortes se cambiaron rápidamente a otra placa con una lámina de Parafilm M® (American Can Co., Neenah, Wis.)® M y unas gotas de solución de citrato de plomo al 0,4% (p/v).

Tabla VI

PROPORCIÓN ACETONA(100%)-RESINA	TIEMPO
3:1	12 h
1:1	12 h
1:3	12 h
0:4	20 h

Tabla VI. Proporciones de acetona y resina necesarias para la correcta inclusión de las muestras. También se indica el tiempo en que éstas deben mantenerse en cada una de las proporciones.

Las rejillas se retiraron del tinte después de 10 min de contacto y se lavaron tres veces con agua. La obtención de las micrografías se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 (JEOL, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara megaview II para la captación de imágenes

12.5.2- Análisis por microscopía electrónica de barrido, SEM (Scanning Electron Microscopy)

El ensayo de quimiotaxis de las teliosporas fue repetido siguiendo el método de Sjobland *et al.* (1978), como se describe en el apartado 10 (*Ensayos de quimioatracción*) en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 como agente quimioattractante (0,41 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El contenido de los capilares fue depositado en tubos eppendorf y analizado por SEM siguiéndose para ello el protocolo descrito a continuación.

Las muestras recuperadas fueron centrifugadas a 1.252 x *g* durante 5 min en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) y a continuación resuspendidas en tampón PBS 0,1 M, pH 7,2. Se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones, resuspendiéndose entonces la muestra en 500 μL de glutaraldehído al 3% (v/v) preparado en PBS para proceder a la fijación

de las células. Se realizaron 3 lavados con PBS, de 5 min cada uno. La post-fijación se llevó a cabo durante 2 h a temperatura ambiente en presencia de tetróxido de osmio al 1,0% (v/v) preparado en tampón PBS.

El proceso de deshidratación se llevó a cabo embebiendo las muestras en concentraciones crecientes de acetona, 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100% (v/v), realizando dos cambios por disolución nueva cada 30 min. Para la visualización de muestras por SEM, fue necesaria su completa desecación en un secador de punto crítico con acetona y CO₂ líquido. A continuación, se recubrieron con una capa de oro/paladio y se escanearon a 20KV empleando un microscopio de barrido JEOL JSM-6400 (JEOL, Tokyo, Japan) equipado con un sistema de espectroscopia de energía dispersiva (EDS). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el programa INCA (Oxford) incorporado al equipo.

12.5.3-Localización de la actina por TEM mediante anticuerpos unidos a ferritina

Se incubó 1,0 mg de teliosporas previamente hidratadas con agua destilada durante 1,0 h (1,0 mg·mL⁻¹) en presencia de 1,0 mL de a) HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 (0,41 mg·mL⁻¹), b) HMMG + Lat A 5 µM o c) agua destilada (control).

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 5 h y agitación (125 oscilaciones·min⁻¹). Transcurrido ese tiempo, el medio de incubación fue eliminado por centrifugación durante 1,0 min a 9.000 x g en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA). Se añadieron entonces a las teliosporas en el precipitado 1,5 mg de ferritina-anti-β-actina (AC-15, Tebu-Bio Santa Cruz Biotechnology, INC) preparada en 2 mL de tampón PBS 10 mM, pH 6,7, incubándose la mezcla a 26°C durante 30 min. Posteriormente las células fueron recuperadas por centrifugación a 5.000 x g durante 10 min y lavadas con tampón PBS durante 10 min.

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 12.5.1 (*Análisis por microscopía electrónica de transmisión, TEM (Transmission Electron Microscopy)*) para la visualización de la actina marcada con ferritina en las células de *S. scitamineum* tras los distintos tratamientos.

13-ENSAYOS DE GERMINACIÓN

13.1-ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN AGAR 0,1% (P/V)

Los ensayos de germinación fueron llevados a cabo sobre porta-objetos excavados. Fueron depositados 10 µL de una suspensión de teliosporas, previamente

hidratadas en agua destilada durante 1,0 h ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sobre 50 μL de agar al 0,1% (p/v) conteniendo diferentes agentes (ver Tabla VII). En todos los casos éstos fueron sustituidos por agua destilada para la realización del control. Los porta-objetos fueron incubados en cámara de humedad a 25°C durante tiempos variables. Las

muestras fueron visualizadas según se describe en el apartado 12.2 (*Microscopía óptica en campo claro*). Se tomaron 3 fotografías al azar de cada tratamiento (comprendiendo un área de $0,56 \text{ mm}^2$ cada una). En la Tabla VII se presentan las diferentes posibilidades de ensayo.

Tabla VII

Objetivo		Agente adicionado al medio de incubación	Tiempo de incubación
Comparación del efecto de las HMMG producidas por los cvs. My 55-14 y B 42231 sobre la germinación	Germinación en presencia de concentraciones crecientes de HMMG y SCA de plantas no inoculadas de ambos cvs.	HMMG o SCA de plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 o B 42231 $0,06, 0,14$ y $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	15 h
	Germinación en presencia de HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de ambos cvs.	HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 o B 42231 $0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	
Valoración del efecto de Concanavalina A (Con A) * sobre la germinación		Con A $0,06, 0,14$ y $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	15 h

Tabla VII. Ensayo de germinación en agar al 0,1% (p/v) en relación al agente adicionado al medio y al tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 13. *Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. **Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).

Tabla VII (continuación)

Objetivo		Agente adicionado al medio de incubación	Tiempo de incubación
Análisis comparativo del efecto de las glicoproteínas HMMG y las FP sobre la germinación	Efecto de concentraciones crecientes de HMMG, FP, SCA, y arginasa fúngica semi-purificada sobre la germinación	HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,06, 0,14 y 0,25 mg·mL ⁻¹	15 h
		FP 6 h 0,06, 0,14 y 0,25 mg·mL ⁻¹	
		SCA semi-purificada de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,06, 0,14 y 0,25 mg·mL ⁻¹	
		Arginasa semi-purificada de FP 6 h 0,06, 0,14 y 0,25 mg·mL ⁻¹	
		Mezcla equimolecular 0,06, 0,14 y 0,25 mg·mL ⁻¹ de FP y SCA	
	Competencia entre las distintas FP y la SCA durante la germinación	FP producidas durante 1,5 h de germinación 0,14 mg·mL ⁻¹	15 h
		FP producidas durante 3 h de germinación 0,14 mg·mL ⁻¹	
		FP producidas durante 4,5 h de germinación 0,14 mg·mL ⁻¹	
		FP producidas durante 6 h de germinación 0,14 mg·mL ⁻¹	
		Mezcla equimolecular 0,14 mg·mL ⁻¹ de FP-1,5 h y SCA	
		Mezcla equimolecular 0,14 mg·mL ⁻¹ de FP-3 h y SCA	
		Mezcla equimolecular 0,14 mg·mL ⁻¹ de FP-4,5 h y SCA	
	Efecto del nivel de actividad arginasa sobre la germinación: incubación con AFA IFA y SCA	Mezcla equimolecular 0,14 mg·mL ⁻¹ de FP-6 h y SCA	15 h
		AFA 0,14 mg·mL ⁻¹	
		IFA parcialmente inactivada 0,14 mg·mL ⁻¹	
		IFA totalmente inactivada 0,14 mg·mL ⁻¹	
		SCA de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 0,14 mg·mL ⁻¹	
Análisis de la implicación de la actina y la miosina en la germinación por medio de la incubación de las teliosporas en presencia de agentes bloqueantes de la funcionalidad del citoesqueleto	Efecto en función de la concentración del inhibidor	Fal * 0,06, 0,21, 0,72 mM	15 h
		Lat A * 0,02, 0,08, 0,26 µM	
		Ble * 0,62, 2,16 y 5,78 µM	
		Noc ** 0,5, 2 y 8 µg·mL ⁻¹	
	Efecto en función del tiempo de incubación	Fal 0,21 mM	0-18 h
		Lat A 0,08 µM	
		Ble 2,16 µM	
		Noc 8 µg·mL ⁻¹	
Valoración del efecto de la putrescina (PUT) sobre la germinación		PUT 0,1, 1, 5, 7,5 y 10 mM	15 h
Análisis del efecto causado por el extracto de lignanos obtenido a partir de tejido meristemático de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231 sobre la germinación		Lignanos de tejido meristemático de plantas no inoculadas del cv. My 55-14	15 h
		Lignanos de tejido meristemático de plantas inoculadas del cv. My 55-14	
		Lignanos de tejido meristemático de plantas no inoculadas del cv. B 42231	
		Lignanos de tejido meristemático de plantas inoculadas del cv. B 42231	

Tabla VII (continuación). Ensayo de germinación en agar al 0,1% (p/v) en relación al agente adicionado al medio y al tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 13. *Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. **Proporcionado por EMD Biosciences (Billerica, MA).

13.2-ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN TUBOS EPPENDORF Y VISUALIZACIÓN EN CÁMARAS DE NEUBAUER

13.2.1-Germinación de teliosporas en presencia de PAs

Se mantuvieron 1,5 mg de teliosporas en agua destilada conteniendo concentraciones crecientes de PUT o SPD (0,1, 0,5, 7,5 y 10 mM) y estreptomicina 50 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA) hasta 70 h a 25°C en constante agitación (125 oscilaciones·min⁻¹). Como control se utilizó una muestra de teliosporas incubada en ausencia de PAs.

Muestras de 100 µL fueron tomadas de cada suspensión tras tiempos variables de incubación (16, 20, 40 y 70 h) y depositadas en una cámara de Neubauer (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany) para su visualización por microscopía óptica, como se describe en el apartado 12.2 (Microscopía óptica de campo claro).

La organización en cuadrados de la cámara de Neubauer (Figura 32) permitió cuantificar en todos los casos el mismo volumen de muestra ($56 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$), correspondiente a los cuadrados de las diagonales que indica la Figura 32, cada uno con un volumen de $6,25 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$ (0,25 mm·0,25 mm·0,1 mm). Los resultados

fueron expresados como porcentaje de germinación.

Figura 32

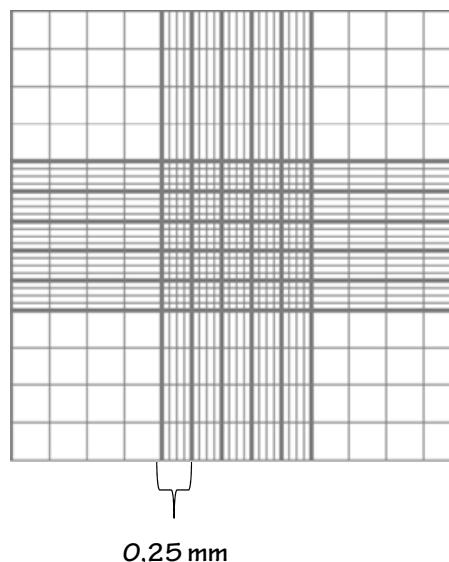


Figura 32. Representación de la red de conteo existente en la cámara de Neubauer. Se indican los cuadrados en los que se valoró el porcentaje de germinación en cada tratamiento, señalados por el paso de las dos diagonales.

13.2.2-Germinación de teliosporas y desarrollo de esporidios en presencia de lignanos comerciales

Se incubaron 0,5 mg de teliosporas previamente hidratadas durante 1,0 h en agua destilada ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) hasta 80 h en presencia de concentraciones crecientes ($5\text{-}40 \text{ µg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de pinoresinol y secoisolariciresinol comerciales (Sigma, St. Louis, MO, USA) preparadas en agua destilada conteniendo estreptomicina 50 µM (Sigma, St. Louis, MO, USA).

A tiempos variables de incubación (3, 6, 9, 24, 32, 48, 56, 72 y 80 h), se tomaron muestras de 100 µL de cada tratamiento, que fueron dispuestas en una cámara de Neubauer para su visualización por microscopía óptica, como se describe en el apartado 12.2 (*Microscopía óptica de campo claro*).

De igual manera que se describe en el apartado 13.2.1 (*Germinación de teliosporas en presencia de PAs*), se seleccionaron las dos diagonales de cuadrados centrales de la cámara (Figura 32) para el conteo de esporidios, tubos germinativos y teliosporas en las muestras. A partir de estos resultados, se calculó el porcentaje de germinación total, así como el porcentaje de tubos germinativos y esporidios obtenidos en los distintos tratamientos.

Durante las incubaciones se registró la aparición de micelio dicariótico, cuyo nivel de significación en los distintos tratamientos fue clasificado arbitrariamente de 0 a 4, correspondiendo el valor de 0 con la ausencia de micelio y el valor de 4 con la existencia de una alta densidad de micelio en las muestras.

Muestras de las células incubadas en ausencia y en presencia de pinosresinol y secoisolariciresinol (ambos a 40 µg·mL⁻¹) fueron tomadas para su tinción con safranina al 0,5% (v/v) y azul de metileno al 1% (v/v) para visualizar la organización del

material nuclear de las células, según el método de Kwaga *et al.*, 1988.

14-SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS (PAGE- SDS)

14.1-PAGE-SDS Y POSTERIOR TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Algunas de las proteínas obtenidas se sometieron a separación electroforética en geles de poliacrilamida (*polyacrilamide gel electrophoresis* o PAGE) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) (Laemmli, 1970). Se realizaron diferentes separaciones, según el objetivo perseguido. Dichos objetivos fueron los siguientes:

- Análisis comparativo de las bandas obtenidas tras la separación por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% (p/v) de una muestra de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 y una muestra de SCA semi-purificada a partir de las mismas glicoproteínas.
- Análisis comparativo de las bandas obtenidas tras la separación por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) de muestras de HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231.

- Análisis comparativo de las bandas obtenidas tras la separación por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 12% (p/v) de muestras de FP obtenidas tras distintos tiempos de incubación (FP 1,5, FP 3, FP 4,5 y FP 6 h), según se describe en el apartado 3.2 (*Obtención de proteínas fúngicas segregadas por las teliosporas durante su germinación*).

- Análisis de las bandas obtenidas tras el proceso de semi-purificación de la tubulina monomérica (ver apartado 3.5 (*Obtención de tubulina semi-purificada a partir del lisado celular de *S. scitamineum**)) tras la separación por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida al 10%.

Todas las electroforesis fueron llevadas a cabo en un sistema Mini-Protean® (Bio-Rad, Hercules, CA). De la misma casa comercial fueron todos los productos utilizados en el ensayo. Los geles, de 1,0 mm de grosor, estaban formados por el gel separador y el gel concentrante. En el caso de los gel de poliacrilamida al 12% (p/v), el gel separador contenía 3,5 mL de agua destilada, 4 mL de acrilamida-bisacrilamida (N, N'-metilenbisacrilamida) al 30% (p/v), 2,5 mL de tampón Tris 1 M, pH 8,8, y 100 µL de SDS al 10% (p/v). En el último momento se adicionaron 50 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) y 25 µL de TEMED (N',N',N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano), para lograr su

polimerización. En el caso de los geles de poliacrilamida al 10% (p/v) las mezclas contenían 4,2 mL de agua destilada y 3,3 mL de acrilamida-bisacrilamida (N, N'-metilenbisacrilamida) al 30% (p/v), sin existir variación en el resto de volúmenes.

El gel concentrante en todos los casos (al 5%) contenía 2,1 mL de agua destilada, 0,6 mL de acrilamida-bisacrilamida (N, N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v) y 1,3 mL de tampón Tris 0,5 M pH 6,8 y 50 µL de SDS al 10 % (p/v). En el último momento se adicionaron 10 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) y 20 µL de TEMED.

Las mezclas fueron calentadas a 50°C durante 10 min en presencia de tampón Laemmli (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,01% (v/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v)) en una proporción 1:4 (Laemmli: muestra).

En todos los casos se cargaron 7 µg de cada proteína en los geles. Se utilizó una mezcla de proteínas conocidas como patrón de pesos moleculares (Thermo Scientific PageRuler™ Plus; Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK) para la determinación de los pesos moleculares correspondientes a las bandas de las muestras analizadas. De esta mezcla se cargó 1,0 µL en los geles.

El tampón de desarrollo empleado fue Tris-glicina-SDS compuesto por Tris 25 mM, glicina 0,2 M y SDS al 10% (p/v). Las electroforesis se desarrollaron a 120 mV durante 90 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, los geles fueron fijados y marcados con nitrato de plata (Gottlieb y Chavko, 1987), usando el kit de marcaje Silver Stain Plus kit de Bio-Rad (Hercules, CA) y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, que se detalla a continuación:

i) Fijación: los geles se depositaron en cubetas de cristal y se sumergieron durante 20 min en agitación ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$) en 40 mL de una solución que contenía 20 mL de metanol, 4 mL de ácido acético, 4 mL de un concentrado potenciador del fijador (Bio-Rad™) y 12 mL de agua desionizada Milli-Q®.

ii) Lavado: se decantó la disolución y los geles fueron sometidos a 2 lavados de 15 min de duración en agitación ($125 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$) en ≈ 50 mL de destilada (cubriendo el gel)

iii) Tinción: La disolución para la tinción se preparó en el momento, agregando a 35 mL de agua Milli-Q® los siguientes reactivos proporcionados por el kit de marcaje: 5 mL de disolución de plata conteniendo NH_4NO_3 - AgNO_3 al 5% (v/v), 5 mL de disolución reductora (ácido tungstosilícico,

$\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$, al 5% (v/v)) y 5 mL de reactivo de revelado conteniendo formaldehído. Después se añadieron 50 mL de una disolución aceleradora conteniendo Na_2CO_3 al 2,5% (p/v). Los geles fueron sumergidos en dicha disolución hasta que las bandas se hicieron visibles. La reacción se detuvo en presencia de ácido acético al 5% (v/v).

Para el cálculo del peso molecular de las bandas resultantes se calculó su movilidad relativa o R_f (*Retention factor*) definido como la relación entre la distancia recorrida por la banda y la distancia recorrida por el frente electroforético. Los valores de R_f se interpolaron en una recta de regresión definida a partir de la distancia de migración de las proteínas patrón, de las que se conocía su peso molecular.

En el caso de la separación electroforética de las glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de ambos cvs., las bandas correspondientes a las diferentes SCAs fueron identificadas en el gel y sometidas a análisis densitométrico mediante el programa informático ImageJ (National Institutes of Health, US). Los niveles de SCA fueron normalizados con los niveles de SCA contenidos en la fracción HMMG de plantas inoculadas del cv. My 55-14.

14.2-PAGE-SDS Y POSTERIOR TRANSFERENCIA A MEMBRANA (WESTERN BLOTTING) PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

14.2.1-Detección de actina y miosina en las teliosporas de *S. scitamineum*

Se hidrataron 1,3 mg de esporas en tampón PBS 10 mM, pH 6,7, una hora antes del comienzo del experimento. A continuación, las esporas fueron centrifugadas a 4°C a $1.957 \times g$ en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) durante 10 minutos para eliminar el medio de hidratación. Con el fin de lograr el lisado celular se añadieron a la muestra 300 μ L de tampón Laemmli (Laemmli, 1970), tras lo cual las teliosporas se sometieron a un baño de ultrasonidos (3-4 ciclos de 15 s cada uno a 20 KHz). Se realizó una segunda centrifugación a 4°C, esta vez a $13.226 \times g$ durante 15 min.

Las proteínas presentes en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se separaron por electroforesis (PAGE-SDS) en gel de poliacrilamida al 12%, según describe el apartado 14.1 (PAGE-SDS y posterior tinción con nitrato de plata) cargándose en dicho gel 32 μ L de sobrenadante obtenido tras el lisado celular. Una muestra del precipitado obtenido a partir de la centrifugación y resuspendido

posteriormente en tampón Laemmli fue también analizada por electroforesis (20 μ L). Se utilizó como control un lisado de células CHO.K1 de ovario de hámster que contenía β -actina (actina no muscular) y se cargó también un patrón estándar de pesos moleculares conocidos (Thermo Scientific PageRuler™ Plus; Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK). Las proteínas fueron separadas a 120 mV a temperatura ambiente durante 50 min

Transcurrido ese tiempo, se realizó la transferencia de la muestras desde los geles a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon™-P, Millipore) de 0,45 μ m. Se aplicó un amperaje constante de 350 mA durante 75 min. Las membranas se bloquearon con leche deshidratada al 4% (p/v) en tampón Tris-salino (TBS), pH 7,4, durante 1,0 h a temperatura ambiente y fueron lavadas 3 veces con TBS (5 min cada lavado). A continuación, las membranas fueron incubadas durante 12 h a 4°C en presencia del anticuerpo monoclonal anti β -actina IgG1 de ratón (Sigma St. Louis, MO, USA) diluido 1:1000 en TBS conteniendo un 0,1% de Tween. La incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) y diluido 1:5000 en TBS-Tween al 0,1% fue llevada a cabo durante 1,0 h a temperatura ambiente.

Finalmente, las membranas fueron lavadas cuatro veces con 20 mL de TBS-Tween al 0,1% (5 min cada lavado), y se revelaron usando el sistema de quimioluminiscencia SuperSignal Pico (Pierce, Rockford, IL, USA) en un sistema de adquisición de imagen General Electric LAS-4000 (Piscataway, NJ, USA).

Se siguió exactamente el mismo protocolo para la detección de miosina en el interior de las teliosporas, a excepción de los anticuerpos utilizados. Éstos fueron, por un lado, el anticuerpo monoclonal MY21 de ratón dirigido contra la cadena ligera de la miosina (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluido 1:500 en TBS-Tween al 0,1% y por otro lado, anticuerpos de conejo dirigidos contra las cadenas pesadas IIA y IIB de la miosina (anti-MIIA y anti-MIIB), proporcionados por Covance (Berkley, CA) y diluidos 1:2000 en TBS-Tween al 0,1%.

Las membranas que habían sido incubadas con el anticuerpo MY21 lo hicieron posteriormente con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA), diluido 1:5000 en TBS-Tween al 0,1%. Un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) y diluido 1:5000 en TBS-Tween al 0,1% fue utilizado para las membranas que habían sido

incubadas en presencia de anti-MIIA y anti-MIIB.

14.2.2-Detección de tubulina en las teliosporas de *S. scitamineum*

La tubulina semi-purificada, obtenida según describe el apartado 3.5 (*Obtención de tubulina semi-purificada a partir del lisado celular de S. scitamineum*) fue separada de nuevo por electroforesis (PAGE-SDS) en gel de poliacrilamida al 10%, según describe el apartado 14.1 (*PAGE-SDS y posterior tinción con nitrato de plata*).

Para la realización de la transferencia a membrana de las proteínas o *Western Blotting* se siguió el protocolo detallado en el apartado 14.2.1 (*Detección de actina y miosina en las teliosporas de S. scitamineum*) utilizándose anticuerpos para la detección de tubulina en las muestras. Los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo monoclonal anti-tubulina acetilada de ratón (clon 6-11B-1), el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -tubulina (clon TO198) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti- γ -tubulina (clon T6557), todos de Sigma (St. Louis, MO, USA) y diluidos 1:500 en TBS-Tween al 0,1%. El anticuerpo secundario utilizado en todos los casos fue el anticuerpo anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA), diluido 1:5000 en TBS-Tween al 0,1%.

14.3-PAGE-SDS Y ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS FRACCIONES HMMG Y MMMG

El análisis del contenido proteico de las fracciones MMMG y HMMG de plantas no inoculadas de los cv. My 55-14 y B 42231 fue realizado en la Plataforma de Proteómica del Parque científico de Barcelona, (Universidad de Barcelona, España), siguiendo el protocolo de Frias *et al.* (2010).

En primer lugar, las proteínas contenidas en las fracciones HMMG y MMMG ($0,41 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) fueron precipitadas por incubación en acetona 12 h a -20°C . Los sobrenadantes fueron eliminados, y el precipitado fue secado en una centrifuga de vacío.

Las fracciones MMMG y HMMG fueron analizadas por electroforesis en PAGE-SDS (Laemmli 1970), según se describe en el apartado 14.1 (PAGE-SDS y posterior tinción con nitrato de plata). Se utilizaron geles conteniendo un 12,5 y un 8% (p/v) de poliacrilamida para la separación de las fracciones MMMG y HMMG, respectivamente. Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Sigma, Sigma St. Louis, MO, USA). El marcador de pesos moleculares fue proporcionado por Bio-Rad (Hercules, CA).

Las diferentes bandas obtenidas fueron extraídas del gel y lavadas con

tampón bicarbonato amónico y acetonitrilo. Las proteínas fueron reducidas por tratamiento con ditioneitol (DTT) 10 mM durante 30 min y posteriormente alquiladas en presencia de 100 mM de yodoacetamida. Las muestras fueron lavadas nuevamente con tampón bicarbonato amónico y acetonitrilo. Las proteínas fueron digeridas durante toda la noche a 37°C con $0,27 \text{ nmol}$ de tripsina y los péptidos resultantes fueron extraídos del gel en presencia de ácido fórmico al 10% (v/v) y acetonitrilo. Todos los extractos fueron secados en una centrifuga a vacío.

Los péptidos tripticos fueron inyectados para la separación cromatográfica en fase reversa en columnas PepMap C18 ($75 \mu\text{m}$ de diámetro interno y 15 cm de longitud) (Thermo Fisher Scientific Inc, Barcelona, España). Los péptidos eluidos fueron analizados secuencialmente en un espectrómetro de masas nano-ESI-QTOF (Q-TOF Global, Micromass-Waters Manchester, UK) equipo perteneciente al Parc Tecnològic del Vallès, (Barcelona, España).

Los resultados generados en el formato de archivo PKL fueron enfrentados a la base de datos no redundante de secuencia de proteínas del Centro Nacional de Información Biotecnológica o NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el servidor MASCOT. Para la búsqueda en la base de datos,

únicamente los espectros de masa en tándem (MS/MS) de los iones doble y triplemente cargados (+2 y +3) fueron utilizados.

La detección de proteínas DIR en las glicoproteínas de MMMG/HMMM sugirió que éstas podrían desempeñar un papel importante en la defensa de la planta ante la enfermedad. Es por ello que los niveles de expresión de la enzima fueron analizados en las plantas de caña de azúcar antes y después de la infección experimental.

15-CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES PARA CAD Y PROTEÍNAS DIR

Los niveles de expresión del gen codificante para la proteína dirigente DIR16 (gen *SofDIR16*) fueron valorados en el tejido meristemático y foliar de plantas inoculadas (con agua y esporidios) y no inoculadas (control) de los cv. My 55-14 y B 42231 que habían sido recogidas 6 h después de la inoculación. La expresión temprana de las proteínas DIR fue también analizada en el tejido meristemático de las plantas recogidas 3 h post-inoculación, para ambos cvs.

Paralelamente, se realizó el análisis de la expresión del gen para la enzima CAD (*SofCAD*), cuya acción está secuencialmente

relacionada con la de las proteínas DIR en la ruta de producción de lignina/lignanós.

15.1-AISLAMIENTO DEL ARN

Se homogeneizaron 300-400 mg de tejido de las diferentes muestras obtenidas según se detalla en el apartado 2.2 (*Obtención de tejido meristemático y foliar*) en 1,0 mL de TRIzol (Invitrogen™, Life Technologies, Inc., Thermo Fisher Sci., España), tras lo cual fueron incubados durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2 mL de cloroformo a las muestras, que fueron homogeneizadas e incubadas durante 3 min a temperatura ambiente y centrifugadas durante 15 min a $12.000 \times g$ en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA).

El ARN total extraído, contenido en el sobrenadante tras la centrifugación, fue purificado usando el kit tPureLink® RNA (Ambion, Thermo Fisher Sci., España), y siguiendo el protocolo detallado por el fabricante. La concentración de ARN en las muestras fue determinada por medición espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Para ser considerado ARN puro el cociente A_{260nm}/A_{280nm} debía ser >2 .

Finalmente, las muestras, cada una diluida a una concentración de 200 ng/μL,

fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

15.2 -TRANSCRIPCIÓN INVERSA

EL ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir del ARN obtenido usando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™, Thermo Fisher, España), según detalla el protocolo del fabricante.

15.3-PCR SEMICUANTITATIVA

Tras la síntesis del ADNc, éste fue amplificado en las muestras con el kit Taq PCR Master Mix (Qiagen, España) y en presencia de los cebadores (*primers*) para los genes codificantes de CAD y DIR16 (Sigma-Aldrich® Chem. Co, St. Louis, USA), cuyas secuencias eran, para DIR16:

5'-GGCCAATCTGAGAAGCGTCCT-3'
(forward, FWD)

5'-CACCACCGCCTCGTTAAG-3'
(reverse, REV);

para CAD:

5'-GCTGCGTCGTCGAACCGTGAG-3'(FWD)

5'-CGGCAAGAACGCGACAAG-3'(REV).

Se utilizó una región conservada entre las secuencias del gen para el ARN ribosómico 18S de centeno, trigo, cebada y arroz para diseñar los siguientes cebadores:

5'-TCAACGAGGAATGCCTAGTAAGC-3'(FWD)

5'-ACAAAGG GCAGGGACGTAGTC-3'(REV).

La expresión constitutiva de este gen se utilizaría como control interno de la reacción.

La PCR fue llevada a cabo por sucesión de 30 ciclos para la amplificación del gen *SofDIR16* y 26 ciclos para la amplificación del gen *SofCAD* en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., USA). En cada uno de los ciclos las muestras se mantenían 20 s a 95°C , 30 s a 60°C y 35 s a 72°C . La amplificación en cada caso fue confirmada por separación de las muestras en geles de agarosa al 2,6% conteniendo bromuro de etidio (Sigma-Aldrich® Chem. Co, St. Louis, USA) y la densidad óptica de las bandas resultantes tras la separación fue valorada mediante un transiluminador Epichem Darkroom (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA). La adquisición y el análisis de las imágenes fue llevada a cabo mediante el programa Labworks 4.5.

15.4-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA O q RT-PCR

La expresión de los genes para DIR16 y CAD en los diferentes tejidos fue cuantificada por qPCR. Se prepararon muestras de 10 μL para el análisis, conteniendo cada una 2,5 μL de ADNc, 0,6 μL de una mezcla de los cebadores (FWD y REV) a una concentración de 10 μM cada uno, 1,9 μL de agua

destilada y 5 μL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher, España).

El análisis fue llevado a cabo en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (España). La amplificación y la detección fue desarrollada en placas para PCR de 384 pocillos y utilizando el kit TaqMan universal PCR 2X Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher, España). La expresión del gen 18 S fue utilizada como control interno del análisis. Todas las reacciones se realizaron por duplicado, usando el sistema para PCR a tiempo real 7900HT (Applied Biosystems, Thermo Fisher, España) y siguiendo el protocolo detallado por el fabricante. Los ciclos seguidos durante la reacción fueron: a) un ciclo de 2 min a 50°C, b) un ciclo de 10 min a 95°C, c) 40 ciclos de 15 s a 95°C y un ciclo de 1 min a 60°C.

16-EXPERIMENTOS DE POLIMERIZACIÓN *IN VITRO* DE MICROTÚBULOS (MT)

16.1-POLIMERIZACIÓN *IN VITRO* DE MT EN PRESENCIA DE NOCODAZOL (NOC)

Se intentó valorar si la polimerización de la tubulina extraída de las células de *S. scitamineum* según el protocolo descrito en 3.5 (Obtención de tubulina semi-purificada a

partir del lisado celular de *S. scitamineum*) era sensible a la acción del nocodazol (Noc), un agente despolimerizante utilizado comúnmente en ensayos de polimerización microtubular en células eucariotas (Zieve *et al.*, 1980).

Los ensayos fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo de Castoldi y Popov (2003), en cubetas de espectrometría conteniendo 100 μL de tubulina semi-purificada (0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 600 μL de glicerol, 600 μL de tampón PIPES polimerizante y 200 μL de agua Milli-Q®.

Se añadieron concentraciones crecientes de Noc (EMD Biosciences, Billerica, MA) de manera que éstas alcanzaran en las cubetas valores finales de 0,5, 2 y 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Un control fue realizado en ausencia de Noc. La polimerización fue disparada por adición de ATP y GTP (concentraciones finales de 1,5 mM y 0,5 mM, respectivamente). La polimerización de la tubulina fue valorada por incremento de absorbancia de las muestras a 350 nm. El experimento fue llevado a cabo durante 90 min en un espectrofotómetro Unicam Helios β (Spectronic Unicam, Cambridge, UK), midiéndose la absorbancia de las muestras cada 15 min. La termostatación del espectrofotómetro mediante un baño de agua Hetofrig CB60VS (Heto Lab Equipment A/S, Birkerød, Dinamarca),

permitió mantener las muestras a 37°C durante los 90 min de ensayo.

16.2-POLIMERIZACIÓN *IN VITRO* DE MT EN PRESENCIA DE PAs

Tubulina contenida en las teliosporas de *S. scitamineum* y semi-purificada según se detalla en el apartado 3.5 (*Obtención de tubulina semi-purificada a partir del lisado celular de S. scitamineum*), fue utilizada para los ensayos de polimerización *in vitro* en presencia de PAs, siguiendo el método de Castoldi y Popov (2003) con modificaciones. Los ensayos fueron realizados tal y como fue descrito en el apartado 16.1 (*Polimerización in vitro de MT en presencia de nocodazol (Noc)*) en presencia de concentraciones crecientes (0,1-7,5 mM) de PUT o SPD comerciales. La polimerización de la tubulina fue valorada por incremento a lo largo del tiempo (0-150 min) de la absorbancia de las muestras medida a 350 nm.

17- ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO Y LA CONJUGACIÓN DE COLONIAS DE ESPORIDIOS DE *S. scitamineum*

En una misma placa de Petri se dispusieron gotas de 0,4 mL de PDA al 4,2% (p/v) conteniendo diferentes agentes (ver Tabla VIII), con el fin de analizar el efecto que

éstos tenían sobre el crecimiento y la conjugación de colonias de esporidios de *S. scitamineum*. Sobre el medio PDA solidificado se depositaron 5 µL de una suspensión de esporidios (aislados o compatibles entre ellos, según se indique para cada ensayo). Un control, sustituyendo el agente por agua destilada fue siempre incorporado.

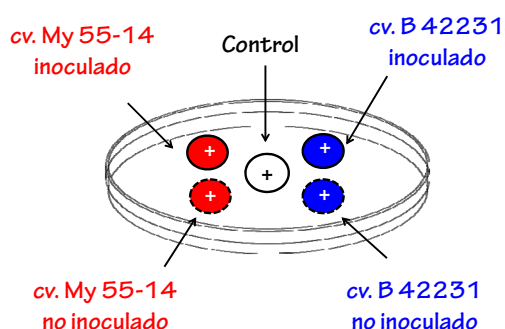
La Figura 33 muestra el diseño experimental utilizado en el análisis del crecimiento y la conjugación de colonias de esporidios, aislados (+) y compatibles (+/-) respectivamente, en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231. El resto de ensayos fue realizado de la misma manera según las condiciones indicadas en cada caso (ver Tabla VIII).

Para cada ensayo se prepararon tres réplicas. Todas las placas fueron selladas con papel Parafilm M® (American Can Co., Neenah, Wis.) y trasladadas a una estufa de cultivo JP Selecta (Incudigit SA, Barcelona, España), donde se incubaron durante tiempos variables de incubación (ver Tabla VIII). Se tomaron imágenes del proceso de crecimiento y la conjugación de las colonias mediante un microscopio estereoscópico Leica EZ4 HD (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza) con cámara digital integrada para la toma de imágenes, las cuales fueron procesadas mediante el

programa Leica Acquire (Leica Microsystems).

Figura 33

a



b

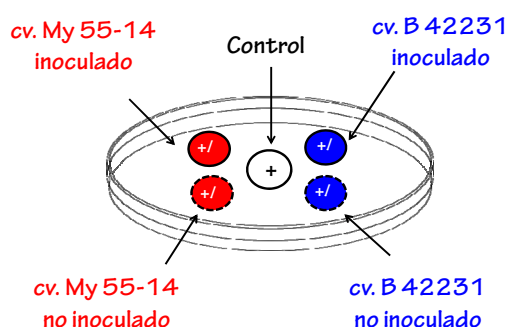


Figura 33. Esquema de la metodología aplicada en el ensayo de crecimiento (a) y conjugación (b) de colonias de esporidios de *S. scitamineum* creciendo en secciones de PDA al 4,2 % (p/v) conteniendo HMMG de ambos cvs. Metodología detallada en el texto, apartado 17.

En los casos en los que se indique (Tabla VIII) la cantidad de proteínas producidas por las colonias, recuperadas del medio con un asa de siembra, fueron cuantificadas. Las colonias recogidas se dispusieron en tubos eppendorf, donde se

valoró su peso, siendo posteriormente sometidas a un baño de ultrasonidos (Ultrasons-Medi II, JP Selecta, Barcelona, España) durante 10 min. Los tubos fueron centrifugados a $9.000 \times g$ durante 10 min a 4°C en una centrífuga Sigma 2 K15 (Sigma St. Louis, MO, USA) y la cantidad de proteínas producidas por las diferentes colonias fue valorada en los sobrenadantes siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951) descrito en el apartado 9 (Valoración de proteínas).

Donde se indica en la Tabla VIII, se tomó una muestra de esporidios creciendo en el borde de las colonias. Las muestras fueron depositadas en tubos eppendorf y resuspendidas en 1,5 mL de agua destilada. 10 μL de cada suspensión fueron transferidas a un porta-objetos donde los esporidios fueron teñidos en presencia de azul de lactofenol al 0,1% (Lloyd y Naidoo, 1981), para el marcaje de su citoplasma y su pared celular. Un calentamiento de la preparación a la llama de un mechero de alcohol durante 10 s fue necesario para fijar la tinción antes de su visualización en un microscopio óptico (ver apartado 12.2 (Microscopía óptica de campo claro).

Tabla VIII

Objetivo	Características del inóculo	Agente adicionado al medio de incubación	Tiempo de incubación
Análisis del efecto de las glicoproteínas HMMG sobre el desarrollo de colonias de esporidios de <i>S. scitamineum</i>	Esporidios aislados (+) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	HMMG 0,41 mg·mL ⁻¹ de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231	Hasta 48 h Visualización a las 24, 29 y 48 h
	Mezcla 1:1 de esporidios compatibles (+ y -) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	HMMG 0,41 mg·mL ⁻¹ de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231	
Análisis del efecto de lignanos comerciales sobre el desarrollo de colonias de esporidios de <i>S. scitamineum</i>	Esporidios aislados (+) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	Pinoresinol * comercial 5, 10, 20 y 40 µg·mL ⁻¹	Hasta 48 h Visualización a las 24, 29 y 48 h **Tinción con azul de lactofenol de esporidios tomados a las 96 h del borde de las colonias **Valoración de la cantidad de proteínas a las 24, 48, 72 y 96 h
		Secoisolariciresinol * comercial 5, 10, 20 y 40 µg·mL ⁻¹	Hasta 48 h Visualización a las 24, 29 y 48 h **Tinción con azul de lactofenol de esporidios tomados a las 96 h del borde de las colonias
		Mezcla de lignanos comerciales (pinoresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, isolariciresinol) 5, 10, 20 y 40 µg·mL ⁻¹	Hasta 72 h Visualización a las 24, 48 y 72 h
	Mezcla 1:1 de esporidios compatibles (+ y -) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	Pinoresinol comercial 5, 10, 20 y 40 µg·mL ⁻¹	Hasta 48 h Visualización a las 24, 29 y 48 h **Valoración de la cantidad de proteínas a las 24, 48, 72, 96 y 144 h
		Secoisolariciresinol comercial 5, 10, 20 y 40 µg·mL ⁻¹	Hasta 48 h Visualización a las 24, 29 y 48 h
		Mezcla de lignanos comerciales (pinoresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, isolariciresinol) 5, 10, 20 y 40 µg·mL ⁻¹	Hasta 72 h Visualización a las 24, 48 y 72 h
	Esporidios aislados (+) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	Pinoresinol comercial 100 µg·mL ⁻¹	Hasta 92 h Visualización a las 30, 45, 67 y 92 h
	Mezcla 1:1 de esporidios compatibles (+ y -) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹		
	Esporidios aislados (+) $2,6 \cdot 10^3$ esporidios·mL ⁻¹ (1/1000 de la dilución original)		
	Mezcla 1:1 de esporidios compatibles (+ y -) $2,6 \cdot 10^3$ esporidios·mL ⁻¹ (1/1000 de la dilución original)		

Tabla VIII. Variaciones incorporadas en cada ensayo para el análisis del crecimiento y la conjugación de colonias de esporidios de *S. scitamineum* sobre medio PDA al 4,2% (p/v) en relación al inóculo, al agente adicionado al medio y al tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 17. * Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. ** Análisis posteriores a partir de las colonias en crecimiento.

Tabla VIII (continuación)

Objetivo	Características del inóculo	Agente adicionado al medio de incubación	Tiempo de incubación
Análisis del efecto los extractos de lignanos obtenidos a partir de tejido meristemático de los cvs. My 55-14 y B 42231 sobre el desarrollo de colonias de esporidios de <i>S. scitamineum</i>	Esporidios aislados (+) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	Extractos de lignanos de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231	Hasta 48 h Visualización a las 24, 48 y 72 h **Valoración de la cantidad de proteínas a las 24, 48, 72, 96 y 144 h
	Mezcla 1:1 de esporidios compatibles (+ y -) $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL ⁻¹	Extractos de lignanos de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231	
	Esporidios aislados (+) $2,6 \cdot 10^4$ esporidios·mL ⁻¹ (1/100 de la dilución original)	Extractos de lignanos de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 no inoculadas, inyectadas con agua e inoculadas con esporidios	Hasta 96 h Visualización a las 72 y 96 h

Tabla VIII (continuación). Variaciones incorporadas en cada ensayo para el análisis del crecimiento y la conjugación de colonias de esporidios de *S. scitamineum* sobre medio PDA al 4,2% (p/v) en relación al inóculo, al agente adicionado al medio y al tiempo de incubación. Metodología detallada en el texto, apartado 17.* Obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. ** Análisis posteriores a partir de las colonias en crecimiento.

18-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial. Los análisis post-hoc se hicieron siguiendo el test HSD (*Honestly significant difference*) o test de Tukey (Tukey, 1949) en aquellos casos en los que se hubiese rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias tras el ANOVA. Las diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0,01$ o $0,05$, según se indique.

En las Figuras se muestra el error estándar (EE) asociado a las medias

realizadas para cada tratamiento. La ausencia o la presencia de diferencias significativas entre tratamientos son indicadas en las Figuras con letras iguales o distintas, respectivamente.

Resultados

1-EFECTOS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LAS TELIOSPORAS DE *S. scitamineum*

1.1-QUIMIOTRACCIÓN Y CITOAGLUTINACIÓN DE LAS TELIOSPORAS

Con objeto de valorar la existencia de diferencias en el carácter quimioattractante de las glicoproteínas de caña sobre las teliosporas de *S. scitamineum*, se realizaron ensayos de quimioatracción siguiendo el método de Sjobland *et al.* (1978), con ligeras modificaciones, descrito en el apartado 10 (*Ensayos de quimioatracción*) de Material y Métodos. Se utilizaron las fracciones glicoproteicas de alto y mediano peso molecular (HMMG y MMMG, respectivamente) obtenidas a partir de plantas no inoculadas del cv. sensible (B 42231) o resistente (My 55-14), para valorar la existencia de diferencias en el carácter quimioattractante de las glicoproteínas producidas por ambos cvs. Los resultados correspondientes a la incubación de las teliosporas durante tiempos variables con las diferentes glicoproteínas se muestran en la Figura 34.

En presencia de glicoproteínas en el capilar se registró un máximo en el número de teliosporas desplazadas hacia el agente quimioattractante transcurridas 5 h desde el comienzo del estudio. Este aumento fue observado en ambos cvs. y para los dos tipos de glicoproteínas. También en todos

los casos hubo un descenso en el número de células desplazadas hacia el capilar a las 6 h de incubación. De igual manera, se detectó citoaglutinación en el interior de todos los capilares que contenían glicoproteínas (Figura 35).

Figura 34

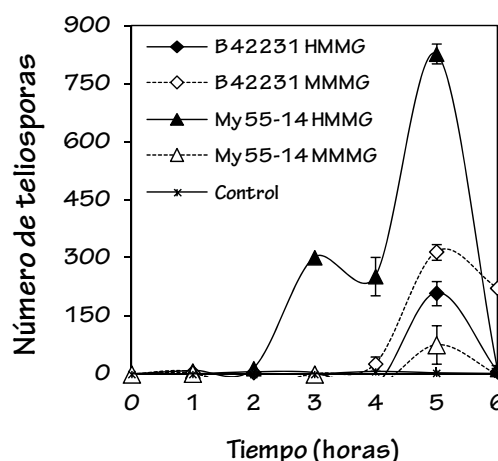


Figura 34. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 (Control), HMMG/MMMG de plantas del cv. My 55-14 o HMMG/MMMG de plantas del cv. B 42231. El experimento tuvo lugar durante 6 h. Las barras verticales indican el Error Estándar (EE) correspondiente a las medias de las valoraciones.

Sin embargo, el incremento en el número de esporas desplazadas hacia el capilar fue claramente mayor cuando se utilizaron glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG) del cv. resistente. Además, en presencia de estas mismas glicoproteínas, se detectó una quimiotaxis temprana, a las 3 h (Figura 34). Esto no

ocurrió en el resto de tratamientos, para los que únicamente se observó un pico de quimioatracción a las 5 h.

El efecto quimioatractante de las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas de My 55-14 fue registrado por medio de la toma secuencial de fotografías durante las 5 h del proceso. En la Figura 36 puede observarse cómo las teliosporas marcadas (*, *) se desplazaron en la dirección del agente quimioatrayente.

Figura 35

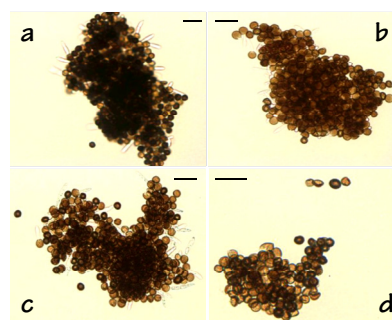


Figura 35. Micrografías en campo claro obtenidas mediante microscopía óptica donde puede observarse la citoaglutinación existente en los capilares tras 5 h de incubación con las distintas glicoproteínas, B 42231 HMMG (a), B 42231 MMMG (b), My 55-14 HMMG (c) y My 55-14 MMMM (d), durante los experimentos de quimiotaxis. Las barras de escala indican 20 µm.

Figura 36

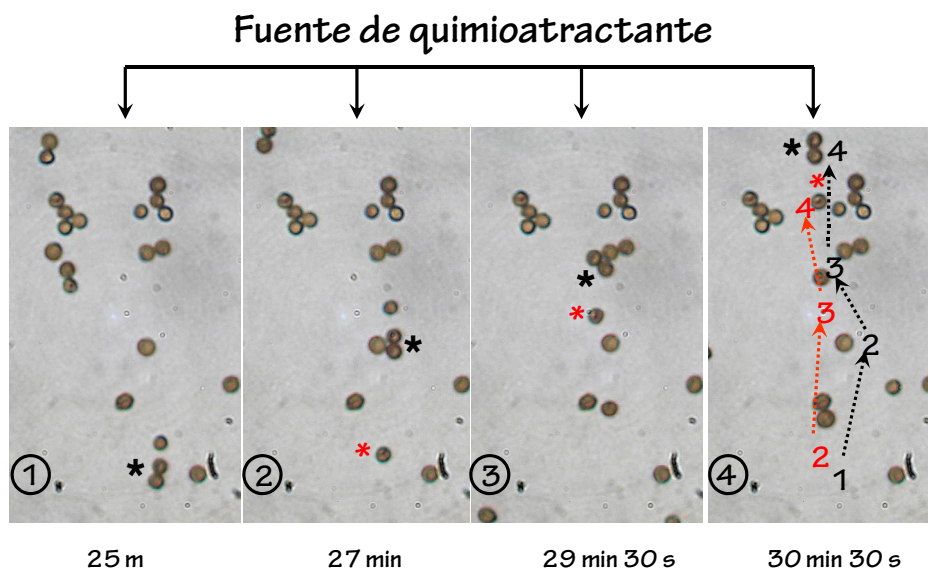


Figura 36. Imágenes obtenidas mediante microscopio invertido que muestran la secuencia temporal del desplazamiento de teliosporas hacia un capilar conteniendo $0,41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 tras 25 min (1), 27 min (2), 29 min 30 s (3) y 30 min 30 s (4) de la inmersión el capilar en el pocillo. Se indica la trayectoria de desplazamiento de una espora aislada (*) y de un grupo de dos esporas(*). Los números indican el orden de la secuencia temporal.

1.2-EFECTOS DERIVADOS DE LA QUIMIOTAXIS

1.2.1-Disminución del tamaño de las aglutinaciones tras el pico de quimiotaxis

Tras la estimulación de las células fúngicas en presencia del agente quimioattractante, se observó que éstas tendían a aglutinarse en puntos comunes, lo cual había sido previamente observado y relacionado con la

inhibición de la capacidad germinativa (Fontaniella *et al.*, 2002). La formación de grupos de teliosporas aglutinadas en un capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 pudo ser verificada mediante la toma sucesiva de imágenes durante 5 h de ensayo. En la Figura 37 se observa un grupo de 13 teliosporas desplazándose hacia una aglutinación mayor, previamente formada.

Figura 37

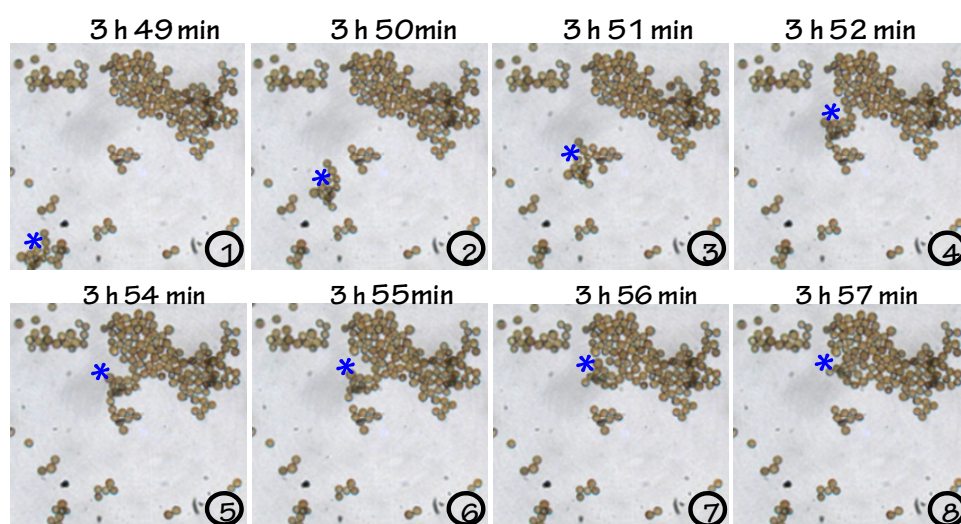


Figura 37. Imágenes obtenidas mediante microscopio invertido que muestran la secuencia temporal del desplazamiento de un grupo de teliosporas (*), durante la formación de una gran aglutinación en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14.

Sorprendentemente, el máximo efecto aglutinante se observó a las 5 h de inicio del experimento de quimioatracción, coincidiendo con la máxima entrada de las teliosporas al capilar (Figura 34). Sin embargo, el número de células que formaban

agregados se reducía considerablemente a las 6 h, a la vez que incrementaba el número de células no agregadas o de aquellas que formaban grupos pequeños (Figura 38 A). La relación entre el número de células agregadas y la talla de los agregados

formados en función del tiempo de exposición a las glicoproteínas se cuantificó según se describe en el apartado 11

(Ensayos de citoaglutinación) de Material y Métodos, mostrándose los resultados en la Figura 38 B.

Figura 38

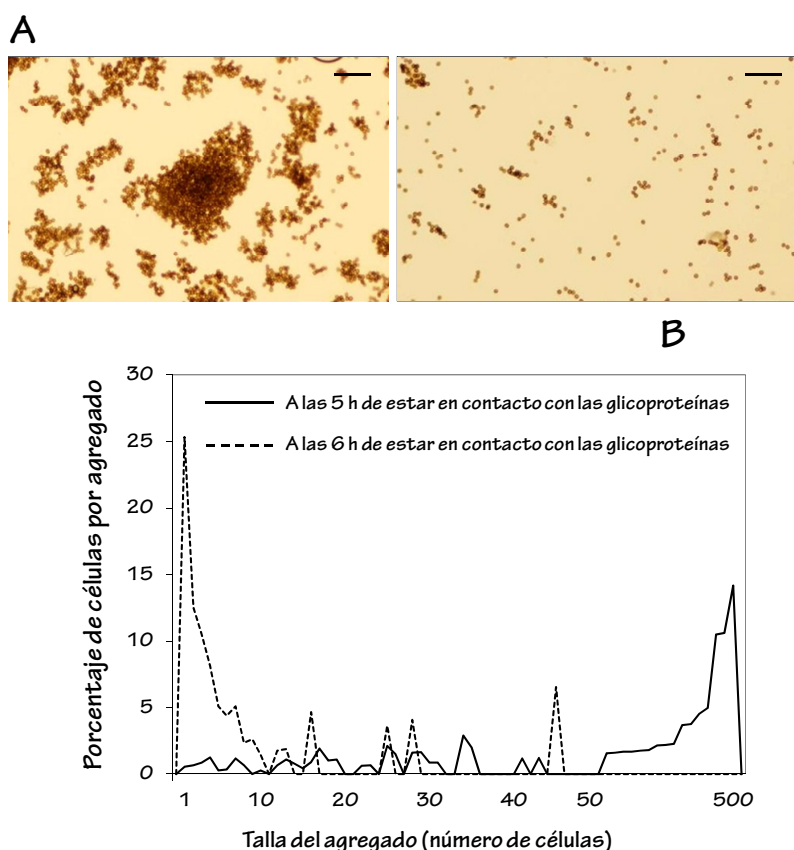


Figura 38. Evidencias de la variación en el grado de agregación de las teliosporas tras 5 ó 6 h (izquierda y derecha, respectivamente) del contacto con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. La barra de escala indica 100 µm (A). Cuantificación del porcentaje de teliosporas implicadas en la formación de los distintos tipos de agregados (de 1 a 500 células) en función del tiempo de exposición a las glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 (5 ó 6 h) (B).

Mientras que a las 5 h de incubación con las glicoproteínas el porcentaje más alto de células estaba constituyendo grupos de 50 a 500 esporas, a las 6 h la mayoría de las teliosporas se encontraban

libres o en formaciones de menos de 10 esporas. A las 6 h no se observó ningún grupo con más de 50 células por agregado. La pérdida de la capacidad aglutinante de las glicoproteínas HMMG a las 6 h coincidió

con la pérdida del efecto quimiotáctico en el mismo momento (Figura 34), lo cual se suponía relacionado.

1.2.2-Liberación de las glicoproteínas retenidas sobre la pared celular a las 6 h

El pico de quimiotaxis observado a las 5 h de tratamiento es inmediatamente seguido por una disminución del número de teliosporas en el interior de los capilares y una pérdida de tamaño en las aglutinaciones originadas. Estos cambios, producidos entre las 5 y las 6 h de experimentación, podrían estar relacionados con una modificación en el patrón de unión de las glicoproteínas a la pared de las teliosporas, sospechando que aquellas podrían desligarse de la superficie de éstas tras el pico de quimiotaxis-citoaglutinación.

Para analizar la interacción de las teliosporas con las glicoproteínas durante la quimiotaxis, las células fúngicas fueron incubadas en presencia de HMMG marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los niveles de fluorescencia de los sobrenadantes recuperados tras 1, 2, 3, 4,5 ó 6 h de incubación fueron cuantificados, mostrándose los resultados en la Figura 39 A. La fluorescencia recuperada en el sobrenadante durante las 4 primeras horas fue casi de un 100% indicando que bajos niveles de glicoproteína

marcada estaban siendo retenidos en la superficie de las células fúngicas. Sin embargo, el porcentaje de fluorescencia recuperada en el sobrenadante caía hasta casi el 25% a las 5 h. Esta disminución, tan significativa, fue probablemente debida a un incremento en la cantidad de proteínas marcadas retenidas sobre la pared celular. Tras las 5 h, la fluorescencia en el sobrenadante incrementaba otra vez, como resultado de una liberación de las HMMG marcadas, lo cual coincide con la pérdida de las capacidades de quimiotaxis y aglutinación (Figuras 34 y 38, respectivamente).

Esta cuantificación fue acompañada de la visualización de las células mediante microscopía óptica (Figura 39 B). A las 5 h se observaban células con fluorescencia y polarizadas, como resultado de la unión de las glicoproteínas a su ligando de pared. Sin embargo, a las 6 h las teliosporas exhibían una escasa fluorescencia en sus paredes celulares, muchas de las cuales aparecieron vacías de contenido celular.

Figura 39

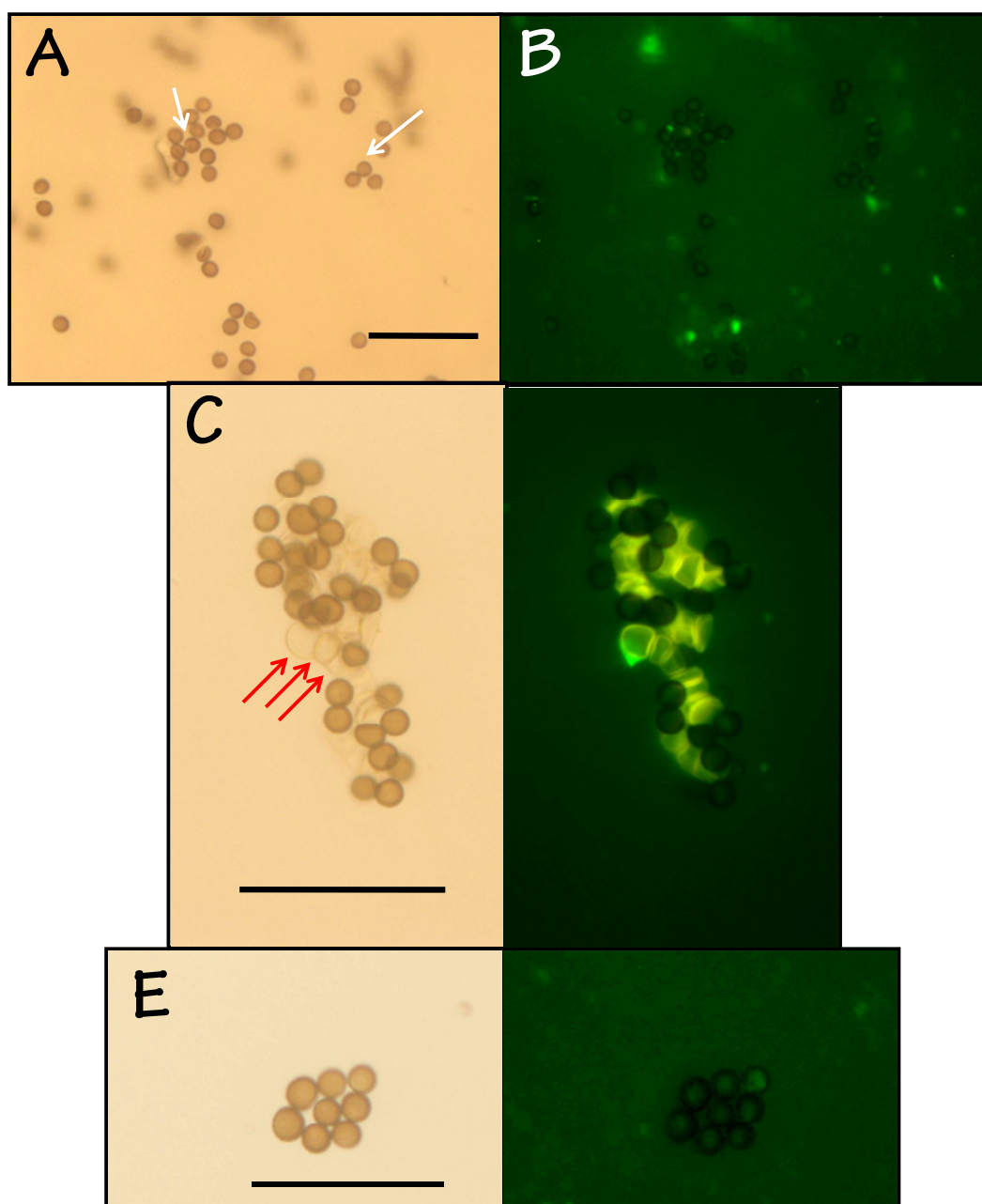


Figura 39. Agregación de las teliosporas tras la estimulación quimiotáctica en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 marcadas con FITC. Niveles de fluorescencia en el sobrenadante tras el contacto de las glicoproteínas con las teliosporas a lo largo del tiempo de ensayo hasta la desaparición de los efectos quimiotáctico y citoaglutinante a las 6 h. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones (A). Micrografías en campo claro (I, III y V) y fluorescencia (II, IV y VI) obtenidas por microscopía óptica que muestran imágenes de teliosporas recuperadas a las 5h (I y II) y a las 6 h (III, IV, V y VI) del comienzo del experimento.. Las flechas blancas indican la presencia de células polarizadas. Las flechas rojas señalan teliosporas que han perdido su protoplasto y se muestran como paredes celulares vacías. Las barras de escala indican 20 μm (B).

1.2.3-Actividad degradativa en las HMMG relacionada con la pérdida del efecto quimiotáctico y aglutinante

En este punto había quedado demostrado que después de las 5 h las glicoproteínas HMMG pierden su capacidad para quedar retenidas sobre la pared de las células fúngicas (Figura 39), las cuales se desagregan (Figura 38) y se liberan al medio desde los capilares durante los experimentos de quimiotaxis (Figura 34). Por ello, el paso inmediatamente posterior fue valorar la existencia de actividades degradativas en el conjunto de HMMG relacionadas con estos efectos. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 8.3.1 (Valoración en las HMMG antes y después del contacto con las teliosporas).

Las actividades β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa y quitinasa fueron valoradas en las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14, antes y después del contacto con teliosporas de *S. scitamineum* (Figura 40).. Los niveles de actividad β -1,4-glucanasa fueron más altos que los de las otras dos enzimas ensayadas. Además su actividad disminuyó significativamente tras el contacto con las teliosporas. Los valores iniciales de las actividades quitinasa y β -1,3-glucanasa fueron más bajos que los correspondientes a la β -1,4-glucanasa, pero sus niveles incrementaron alrededor de

1,75 y 2,45 veces, respectivamente, tras las 3 h de incubación con las teliosporas.

Figura 40

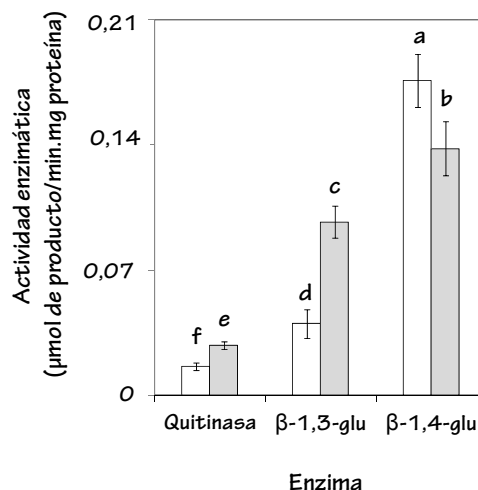


Figura 40. Niveles de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa (β -1,3-glu) y β -1,4-glucanasa (β -1,4-glu) contenidos en las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 antes (en blanco) y después (en gris) del contacto durante 3 h con teliosporas de *S. scitamineum*. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

1.3-IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOATRACTANTE Y CITOAGLUTINANTE EN LAS GLICOPROTEÍNAS

Se valoró si alguna de las enzimas que se sabían contenidas en las glicoproteínas HMMG-arginasa, quitinasa, glucanasas-actuaba como agentes quimioattractantes y/o citoaglutinantes sobre las células fúngicas.

1.3.1-Obtención de arginasa de caña semi-purificada a partir de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14

La arginasa de caña o SCA (*Sugar cane arginase*) fue semi-purificada a partir de las HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 por cromatografía de afinidad, según se detalló en el apartado 3.4 (*Semi-purificación de arginasas contenidas en las glicoproteínas HMMG o en las FP*) de Material y Métodos, de acuerdo con el protocolo desarrollado por Legaz *et al.*, (2004). Las fracciones obtenidas tras la separación que presentaban una mayor actividad arginasa (fracciones 3 y 4, según puede concluirse al ver la Figura 41) fueron utilizadas posteriormente en los experimentos.

Figura 41

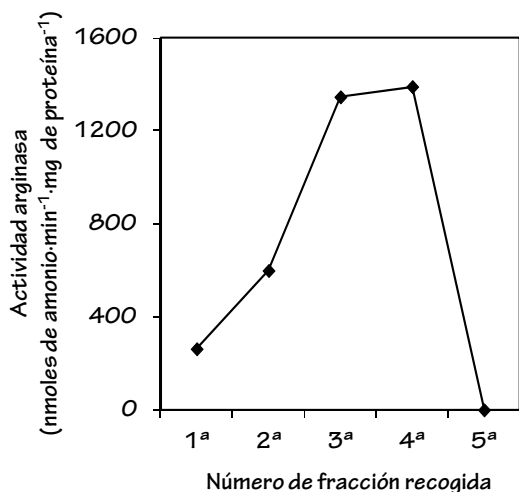


Figura 41. Actividad arginasa valorada en las fracciones obtenidas tras el proceso de semi-purificación de la SCA a partir de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14.

Se realizó una separación electroforética por PAGE-SDS de una muestra de glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas de My 55-14 y de SCA a partir de las mismas HMMG. El revelado posterior del gel por tinción con nitrato de plata permitió confirmar la existencia de dos bandas proteicas de aproximadamente 85 y 100 kDa que debían corresponder a una o dos isoformas de SCA semi-purificada contenida en el total de glicoproteínas HMMG (Figura 42).

Figura 42

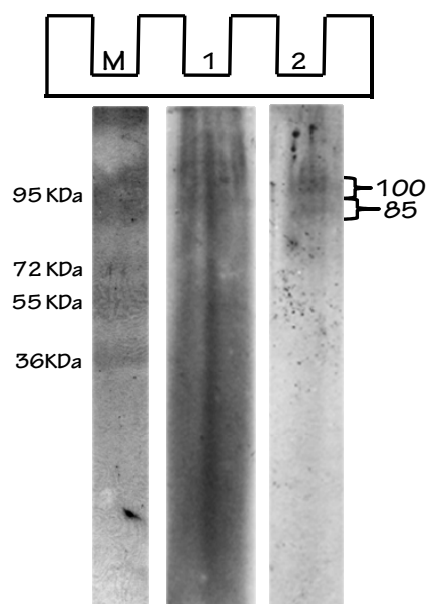


Figura 42. PAGE-SDS y posterior tinción con nitrato de plata de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (1) y de SCA semi-purificada a partir de las mismas HMMG (2). El marcador (M) indica la migración correspondiente a cada peso molecular, en kDa. Se señala las dos bandas, de 85 y 100 kDa, observadas para la SCA.

1.3.2-La SCA y las enzimas degradativas como agentes quimioattractantes

El ensayo de quimioatracción fue llevado a cabo siguiendo el mismo procedimiento de quimiotaxis, descrito en el apartado 10 (*Ensayos de quimioatracción*) de Material y Métodos. Esta vez, se valoró el efecto que la SCA semi-purificada a partir del total de glicoproteínas HMMG y las enzimas degradativas ejercían sobre el quimiotropismo de las teliosporas. Se incluyó un control positivo con HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14. Los resultados se muestran en la Figura 43.

Figura 43

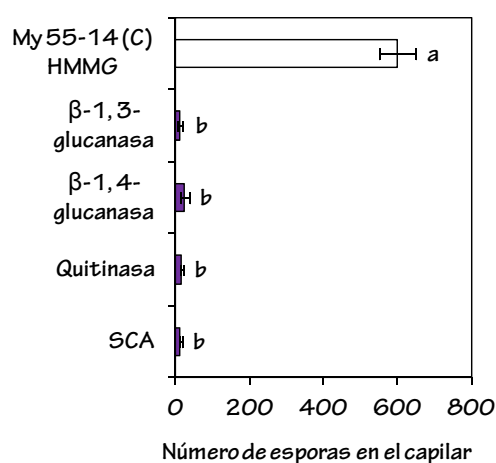


Figura 43. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de My 55-14 (C), β-1,3-glucanasa comercial, β-1,4-glucanasa comercial, quitinasa comercial o SCA. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Ninguna de las actividades enzimáticas valoradas promovieron la motilidad de las teliosporas, llegando ésta a disminuir más de un 95% en relación al control, realizado en presencia de HMMG, para todos los tratamientos realizados.

1.3.3-La arginasa y las enzimas degradativas como agentes citoaglutinantes

De igual manera, se comprobó si alguna de esas enzimas, contenidas en las glicoproteínas HMMG, era responsable de la citoaglutinación de las teliosporas.

Para ello, las células se incubaron durante 3 h en presencia de SCA de plantas no inoculadas del cv. resistente, quitinasa o β-1,4-glucanasa. Dos controles, uno positivo, constituido por la presencia de HMMG de plantas control del cv. My 55-14, y uno negativo, con agua, fueron incorporados al ensayo. Se siguió el protocolo detallado en el apartado 11 (*Ensayos de citoaglutinación*) de Material y Métodos. Las aglutinaciones formadas en presencia de los diferentes agentes fueron clasificadas por tamaño, cuantificándose a continuación el porcentaje de células implicado en la formación de cada uno de los agregados. Los resultados se muestran en las Figuras 44 y 45.

Figura 44

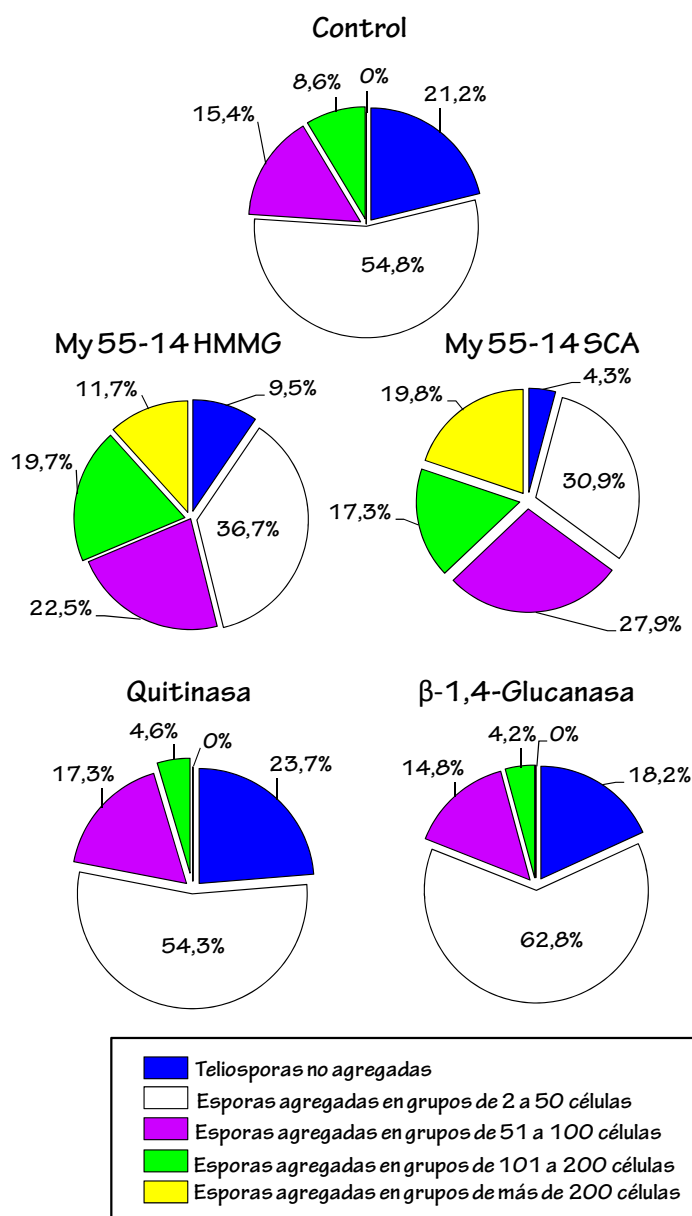


Figura 44. Ensayo de citoaglutinación en presencia de agua (control negativo), de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (control positivo), de SCA semi-purificada, de quitinasa comercial y de β -1,4-glucanasa comercial. Se indica, por tratamiento, el porcentaje celular implicado en la formación de los distintos tipos de agregados, que fueron clasificados por el número de teliosporas que contenían (teliosporas no agregadas; grupos de 2 a 50 células; grupos de 51 a 100 células; grupos de 101 a 200 células y grupos formados por más de 200 células).

En los ensayos realizados en ausencia de agentes potencialmente aglutinantes

(control negativo), la mayoría de las células fúngicas aparecieron dispersas o

configurando grupos de menos de 50 teliosporas (un 76% del total celular).

Únicamente un 8,6% de las esporas estaba implicado en la formación de aglutinaciones de más de 100 células (Figura 44). Estos resultados fueron muy semejantes a los encontrados en presencia de quitinasa o β -1,4-glucanasa, donde apenas un 4% de células se encontraban formando grupos de más de 100 esporas y alrededor de un 80% del total de células se mostraban dispersas o conformando grupos pequeños.

Figura 45

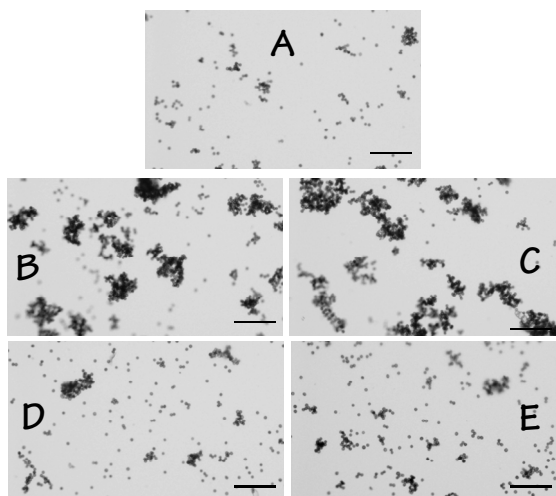


Figura 45. Micrografías en campo claro obtenidas por microscopía óptica tras el ensayo de citoaglutinación en presencia de agua (A), HMMG de plantas control del cv. My 55-14 (B), SCA semi-purificada a partir de las glicoproteínas HMMG (C), quitinasa (D) o β -1,4-glucanasa (E). Las barras de escala indican en todos los casos 100 μ m.

Los resultados variaron drásticamente tras la incubación en presencia de HMMG o de SCA semi-purificada (Figura 44). Menos del 50% del total celular se encontraba en forma dispersa o en grupos pequeños y, en contraposición, más de un 30% se dispuso en aglutinaciones de más de 100 células. Aparecieron, incluso, agregados formados por más de 200 células (Figura 45 B, C), lo cual no fue visualizado en presencia de agua, quitinasa o glucanasa (Figura 45 A, D, E).

1.4-COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG ENTRE AMBOS CVS.

1.4.1-Efecto de las HMMG de ambos cvs. sobre la germinación de las teliosporas

En primer lugar, se valoró el porcentaje de germinación de las teliosporas en presencia de glicoproteínas HMMG producidas por plantas inoculadas y no inoculadas de ambos cvs. con el fin de comprobar si los distintos tipos de glicoproteínas producían efectos diferentes sobre el proceso germinativo. En la Figura 46 se muestran los resultados.

Se observó un descenso (\approx 40%) en la germinación de las teliosporas cuando éstas fueron incubadas en presencia de las glicoproteínas sintetizadas por el cv. resistente. En presencia de las glicoproteínas procedentes de plantas no inoculadas de B 42231 los niveles de

germinación fueron semejantes al control, no existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos. Tras la incubación de las teliosporas con las HMMG procedentes de plantas inoculadas del cv. sensible, estos niveles llegaron incluso a incrementarse en un 28%, lo que indicaba una estimulación de la germinación.

Figura 46

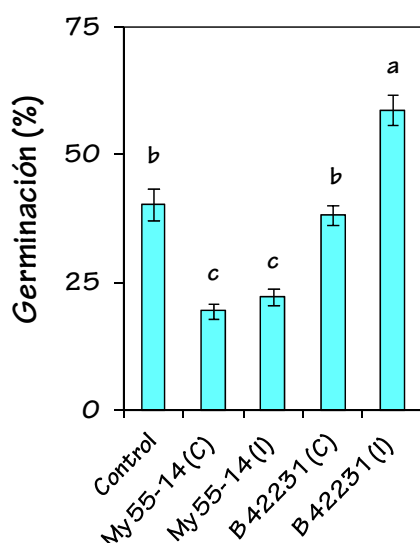


Figura 46. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de glicoproteínas HMMG ($0,41 \text{ mg mL}^{-1}$) de plantas inoculadas (I, inoculadas) y no inoculadas (C, control) de los cv. My 55-14 y B 42231. Un control, correspondiente a teliosporas incubadas en ausencia de glicoproteínas fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Concentraciones crecientes de glicoproteínas HMMG y SCAs semi-purificadas de plantas no inoculadas de ambos cvs. fueron ensayadas para valorar su efecto sobre la germinación de las células fúngicas (Figura 47).

Figura 47

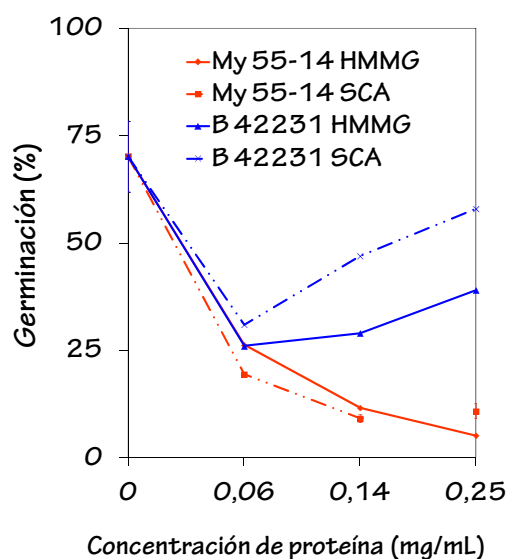


Figura 47. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes ($0,06$ - $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) de glicoproteínas HMMG y SCAs de los cvs. My 55-14 y B 42231. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

Todas las proteínas, a baja concentración, produjeron una disminución de la tasa germinativa en las teliosporas. Sin embargo, cuando la concentración fue incrementada, la respuesta se observó contraria entre ambos cvs. Mientras que la

germinación se recuperó en aquellas células que habían sido incubadas en presencia de la SCA procedente del cv. susceptible, el efecto inhibitorio se agudizó durante la incubación con HMMG y SCA procedentes del cv. My 55-14.

1.4.2-Comparación del contenido y la actividad de SCA entre cvs.

Sospechando que los niveles de actividad arginasa en las glicoproteínas de defensa de la planta podrían estar relacionados con la capacidad de las HMMG para inhibir la germinación de las teliosporas (Figura 46), se valoró la cantidad de la enzima en las distintas muestras que para ello habían sido utilizadas, HMMG de plantas no inoculadas (C) e inoculadas (I) de los cvs. My 55-14 y B 42231.

Una cuantificación relativa de la cantidad de arginasa contenida en las distintas fracciones fue llevada a cabo por medio de una densitometría de las bandas obtenidas tras la separación electroforética de las glicoproteínas HMMG, posteriormente reveladas por tinción con nitrato de plata (Figura 48). Las bandas reveladas en torno a los 95 kDa correspondían a la SCA, como ya había sido demostrado anteriormente a partir de la electroforesis de la enzima pre-purificada (ver Figura 42). Esta banda aparecía en todas las muestras, pero no siempre

mostraba la misma intensidad, indicando que la cantidad de SCA difería de una muestra a otra.

Figura 48

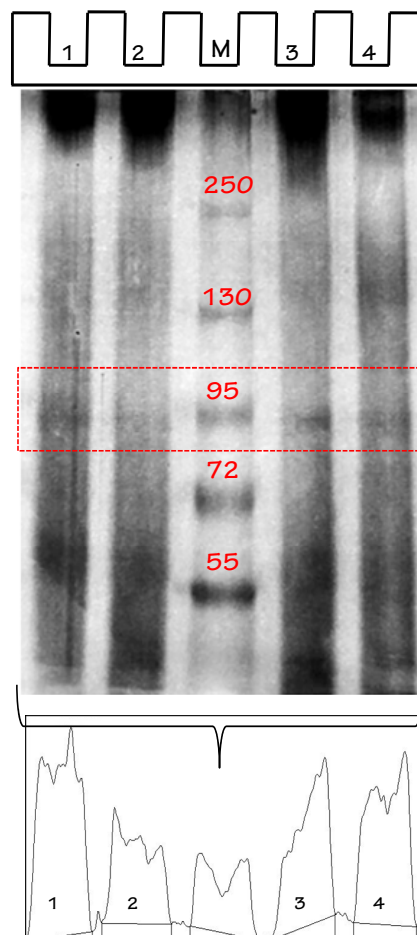


Figura 48. PAGE-SDS y posterior tinción con nitrato de plata de las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas (1) o inoculadas (2) del cv. My 55-14 así como por plantas no inoculadas (3) o inoculadas (4) del cv. B 42231. El marcador, en el centro, indica la migración correspondiente a cada peso molecular, en kDa. Se señalan las bandas correspondientes a las distintas SCAs, de las cuales se realizó una densitometría mediante el programa ImageJ.

La densitometría de las bandas de arginasa demostró que la cantidad mínima de proteína se encontraba en la muestra correspondiente a las HMMG de plantas inoculadas del cv. My 55-14, a la que se adjudicó un valor mínimo para la cuantificación de la proteína (1 unidad relativa). A partir de esta muestra se normalizaron el resto de valores, que son representados en el gráfico de la Figura 49.

Figura 49

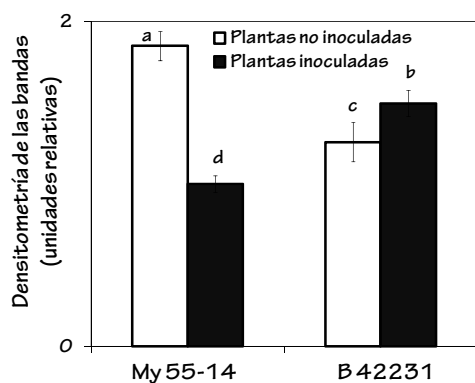


Figura 49. Resultados de la densitometría de las bandas de SCAs, normalizados para la cantidad de arginasa contenida en la muestra de HMMG de plantas inoculadas del cv. My 55-14, a la que se adjudicó arbitrariamente el valor de 1 (unidades relativas). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Las letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

Resultó interesante que, en ausencia de inoculación, las plantas del cv. resistente poseen constitutivamente mayores niveles de SCA en relación al cv. susceptible. La inoculación de las plantas del cv. My 55-14

originó una disminución de casi un 50% en la cantidad de SCA, mientras que ésta aumentó en el cv. susceptible tras la inoculación.

A continuación, se pretendió analizar si había una relación directa entre la cantidad de proteína arginasa cuantificada y su nivel de actividad enzimática. La Figura 50 muestra los resultados correspondientes a los niveles de actividad arginasa detectados en las glicoproteínas de plantas inoculadas y no inoculadas de ambos cvs.

Figura 50

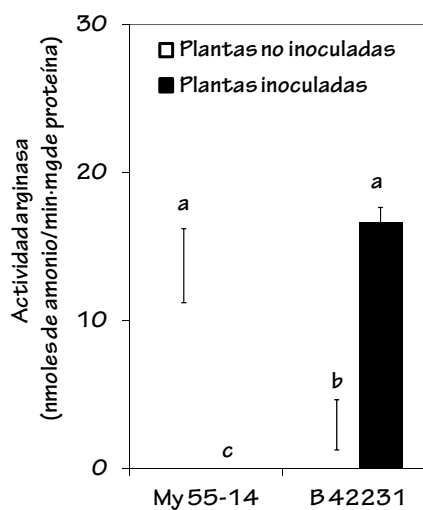


Figura 50. Actividad arginasa contenida en las glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 4223. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Las letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

Los mayores niveles de actividad fueron detectados en las glicoproteínas del

cv. sensible tras su inoculación. En las HMMG producidas por plantas inoculadas del cv. My 55-14 destacó la ausencia de actividad enzimática, a pesar de que en esa misma muestra la proteína había sido previamente detectada por separación electroforética. Así, parece que tras la inoculación la actividad arginasa desaparece en las glicoproteínas del cv. resistente e incrementa considerablemente en el cv. sensible.

Los resultados recogidos en cuanto a 1) cantidad de proteína arginasa en las muestras y 2) niveles de actividad enzimática en las mismas, permitieron estimar la proporción de proteína arginasa activa e inactiva contenida en las distintas glicoproteínas (Figura 51).

Todos estos datos evidencian la existencia de mecanismos defensivos diferentes entre variedades en relación a la cantidad de arginasa activa contenida en el total glicoproteico. Las HMMG producidas por el cv. resistente contienen una menor cantidad de SCA tras la inoculación, pero además, la que queda en el jugo se conserva inactiva. Sin embargo, las plantas del cv. B 42231 tratan de aumentar la cantidad de SCA, así como la actividad de la ya existente tras detectar la presencia del patógeno.

Figura 51

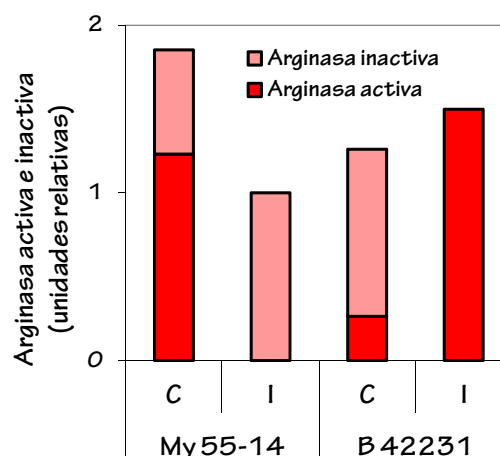


Figura 51. Niveles de arginasa activa (rojo oscuro) e inactiva (rojo pálido) contenidos en las glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (Control, C) de los cvs. My 55-14 y B 42231 y estimados a partir de los resultados de cantidad de SCA (ver Figura 49) y actividad arginasa (ver Figura 50) obtenidos tras los distintos tratamientos.

1.4.3-Efecto de las HMMG y las SCAs de ambos cvs. sobre la citoaglutinación

Tras observar las diferencias existentes en los niveles constitutivos de actividad arginasa entre ambos cvs., se quisieron analizar los efectos de las HMMG de plantas no inoculadas sobre la citoaglutinación de las teliosporas, con el fin de observar cuánto de preparadas están las distintas glicoproteínas ante un ataque. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 11 (*Ensayos de citoaglutinación*) descrito en Material y Métodos, se comparó el efecto que ambas SCAs (de My 55-14 y B 42231), así como el total de

glicoproteínas HMMG, ejercían sobre la aglutinación temprana de las teliosporas,

tratando de simular las primeras momentos de una infección (Figura 52).

Figura 52

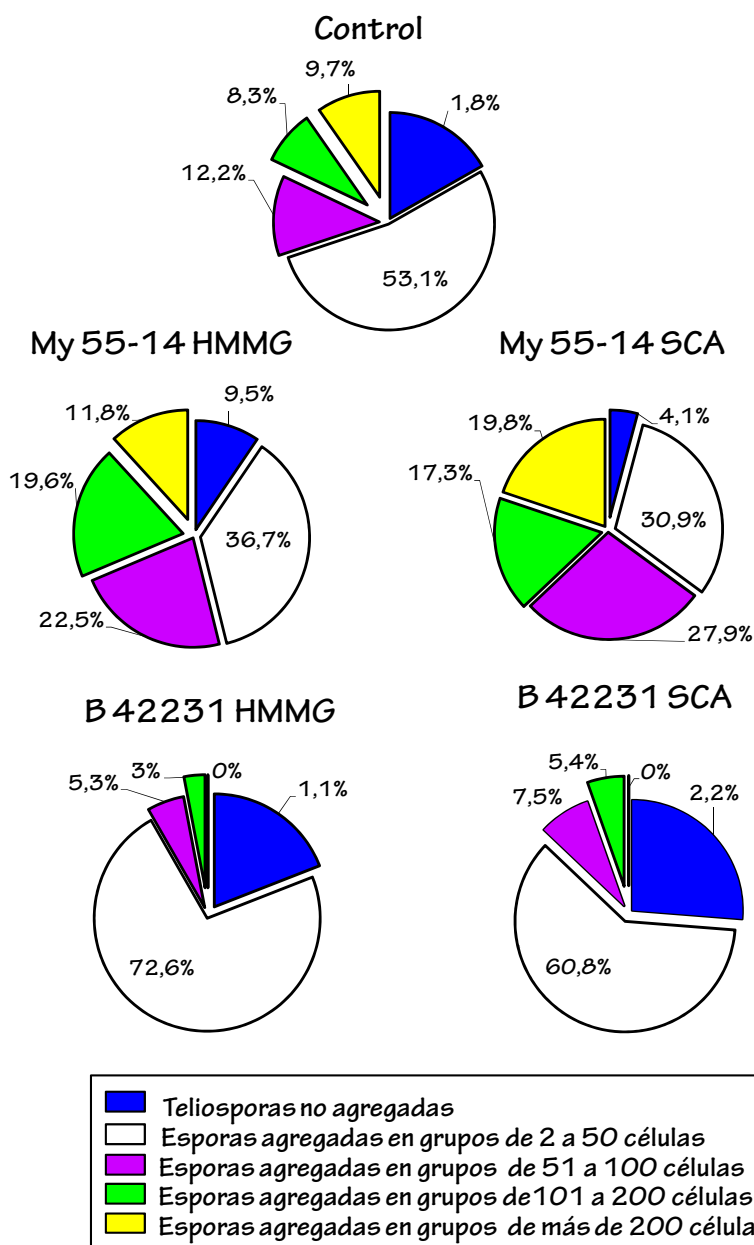


Figura 52. Ensayo de citoaglutinación en presencia de glicoproteínas HMMG y SCAs semi-purificadas de plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 4223. Un control en ausencia de proteína fue incorporado al experimento. Se indica, por tratamiento, el porcentaje celular implicado en la formación de los distintos tipos de agregados, que fueron clasificados por el número de teliosporas que contenían (teliosporas no agregadas; grupos de 2 a 50 células; grupos de 51 a 100 células; grupos de 101 a 200 células y grupos formados por más de 200 células).

Los resultados obtenidos tras la incubación de las teliosporas en ausencia de cualquier glicoproteína (control) revelaron que aproximadamente un 70% de las células se mantenían dispersas o agrupadas en formaciones de 2 a 50 células, mientras que un 30% lo hacía en agrupaciones de mayor tamaño. Sin embargo, el número de formaciones de más de 50 esporas ascendía a un 54% y a un 65% tras la incubación de las células con glicoproteínas HMMG o SCA semi-purificada, respectivamente, del cv. resistente.

Sorprendentemente, las proteínas procedentes del cv. susceptible, por el contrario, incrementaron el porcentaje de esporas dispersas o implicadas en la formación de pequeñas agrupaciones disminuyendo la aparición de aglutinaciones grandes hasta un 9 y un 13%, en presencia de glicoproteínas HMMG o de SCA semi-purificada, respectivamente.

1.4.4-Efecto de las HMMG sobre el crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -)

Se quiso, por último, ensayar el efecto de las glicoproteínas HMMG producidas por plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) de los cvs. My 55-14 y B 42231 en el crecimiento de colonias de esporidios

aislados (+) y compatibles (+ y -) sobre medio PDA al 4,2% (p/v) en condiciones constantes de luz y temperatura. Se siguió para ello el protocolo descrito en el apartado 17 (*Análisis del crecimiento y la conjugación de colonias de esporidios de S. scitamineum*) de Material y Métodos. La concentración inicial de inóculo en ambos casos era de $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹. Los resultados se muestran en la Figura 53.

Todas las colonias crecieron, incluso aquellas que se desarrollaron en presencia de los distintos tipos de glicoproteínas defensivas (Figura 53 A). Sin embargo, la conjugación de esporidios compatibles (+ y -) se retrasó en todas las réplicas en las cuales el patógeno era incubado en presencia de HMMG producidas por el cv. resistente (My 55-14) tal y como representa la Figura 53 B. Ambos tipos de glicoproteínas de My 55-14, las producidas en ausencia (C) o en presencia de inoculación (I), indujeron una aparición tardía del micelio dicariótico. Éste no pudo ser visualizado hasta las 29 h de incubación, mientras que en ese momento, la conjugación era ya bastante intensa para las colonias control y las colonias incubadas en presencia de glicoproteínas HMMG del cv. susceptible. Finalmente, a las 48 h el nivel de conjugación era ya semejante en todas las muestras analizadas.

Figura 53

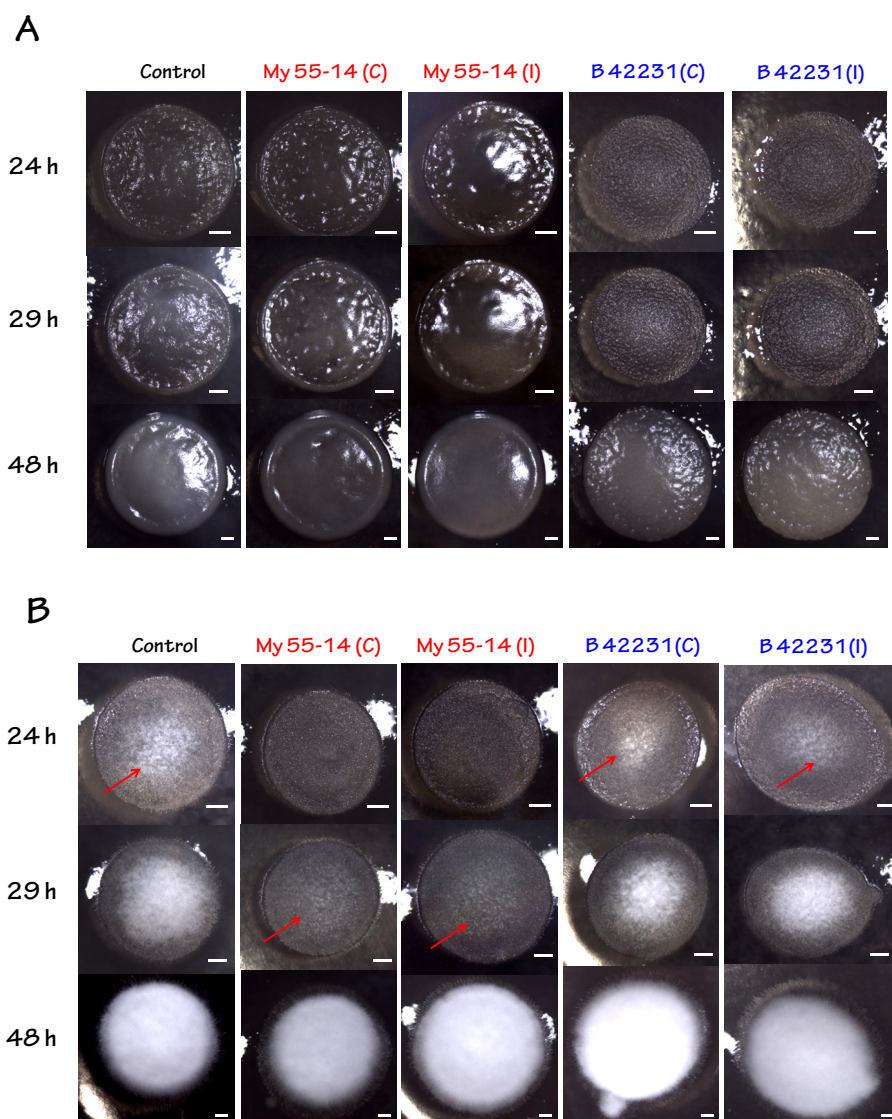


Figura 53. Crecimiento de colonias de esporidios aislados (+), (A), y compatibles (+ y -), (B), sobre medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo glicoproteínas HMMG producidas por plantas control (C) e inoculadas (I) de los cvs. My 55-14 y B 42231. Una colonia control creció en ausencia de glicoproteínas. Las fotografías fueron tomadas a las 24, 29 y 48 h mediante un microscopio estereoscópico. Las flechas señalan la aparición de micelio dicariótico. Las barras de escala indican 1 mm.

2-IDENTIFICACIÓN DEL CARÁCTER LECTÍNICO DE LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG

Con objeto de confirmar si las glicoproteínas de caña de azúcar tenían naturaleza de

lectina, se diseñaron diferentes tipos de experimentos. En primer lugar se realizaron ensayos de germinación en presencia de Concanavalina A (ConA) para establecer si las teliosporas de *S. scitamineum* poseen

ligandos en su pared celular para las glicoproteínas de este tipo de lectinas. Posteriormente, se realizaron ensayos de competencia entre la ConA y las glicoproteínas de defensa de caña de azúcar.

2.1-EXISTENCIA DE LIGANDOS DE PARED EN LAS TELIOSPORAS PARA EL RECONOCIMIENTO DE LECTINAS VEGETALES

La incubación de las teliosporas en presencia de concentraciones crecientes de ConA incrementó el número de células aglutinadas con una consecuente disminución en el número de células libres en el medio. Paralelamente, la adición de altas concentraciones de ConA al medio estimuló la presencia de esporidios libres (Figura 54 B). Sin embargo, la lectina no favoreció la germinación de las teliosporas (Figura 54 A), por lo que el aumento de esporidios tuvo que ser consecuencia de la división por gemación de los esporidios formados previamente.

En la Figura 55 se muestran imágenes de microscopía óptica recogidas para los distintos tratamientos. Se observaron numerosos cambios morfológicos en presencia de la lectina en relación a las teliosporas control (A y B en la Figura).

Figura 54

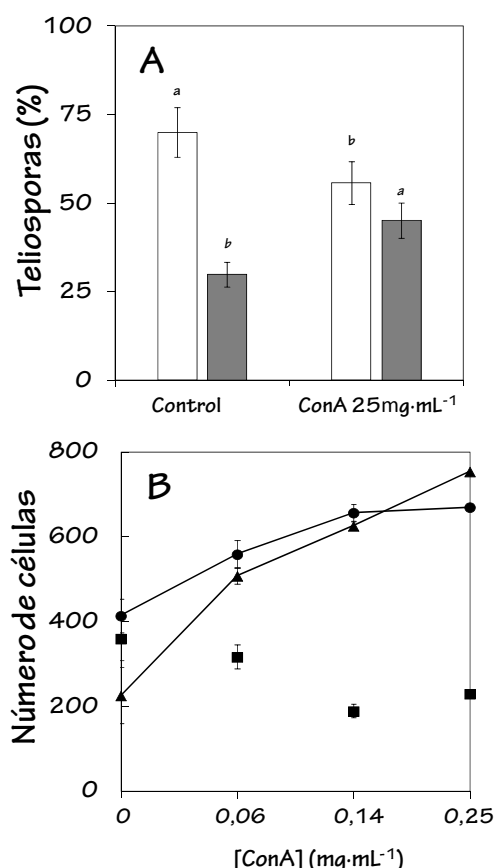


Figura 54. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de ConA 0,25 mg·mL⁻¹. Un control, realizado en ausencia de la lectina fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Se muestra el porcentaje de esporas germinadas (en blanco) y no germinadas (en gris) (A). Número de teliosporas libres (■), agrupadas (●) o esporidios (▲) cuantificados en el medio tras la incubación en presencia de concentraciones crecientes de ConA (0,06-0,25 mg·mL⁻¹) (B). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. En A las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), en redonda para el porcentaje de células germinadas, en cursiva para el porcentaje de células no germinadas.

En primer lugar, las células aparecieron fuertemente agregadas ya en presencia de bajas concentraciones de ConA (C). La germinación de las células fúngicas en presencia de la lectina produjo hifas sorprendentemente largas y ramificadas (Figura 55 C y D) y algunas de ellas presentaban ensanchamientos en su

región más apical (D, E). El incremento en la dosis de Con A añadida hizo más evidente el efecto aglutinante (G) y estimulante de la lectina sobre la división mitótica de los esporidios liberados (F, H, I). Estos aparecían de muy pequeño tamaño en el medio de incubación.

Figura 55

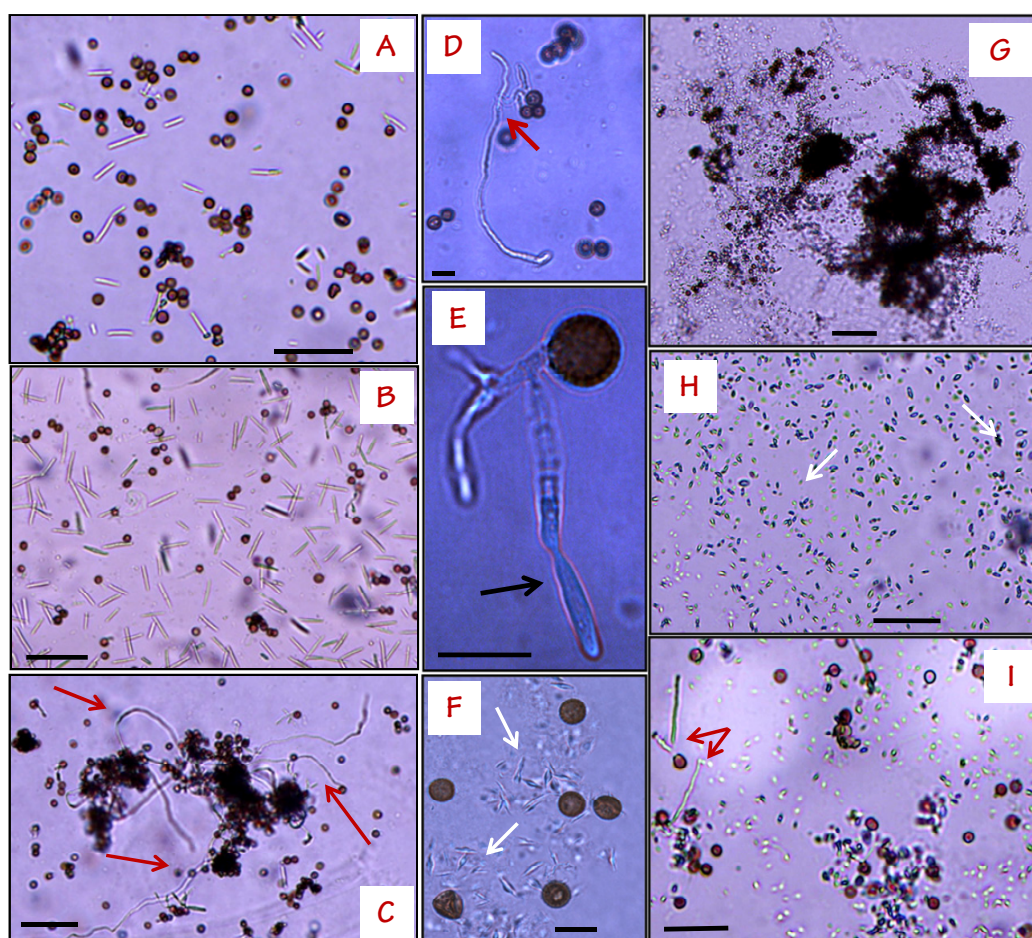


Figura 55. Micrografías en campo claro obtenidas por microscopía óptica correspondientes a teliosporas de *S. scitamineum* incubadas en ausencia (A y B) o en presencia de Con A $0,06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C), $0,14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D y E) o $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (F, G, H, I). Las flechas blancas indican la abundancia de esporidios liberados por gemación; las flechas negras señalan la presencia de un ensanchamiento apical, que fue observado en muchas hifas en presencia de ConA; las flechas rojas resaltan la visualización de hifas alargadas y ramificadas en presencia de la lectina. Las barras de escala indican $50 \mu\text{m}$ en A, B, C, G, H e I y $10 \mu\text{m}$ en D, E y F.

2.2-COMPETENCIA ENTRE LA CON A Y LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG POR SU LUGAR DE UNIÓN A LA PARED FÚNGICA

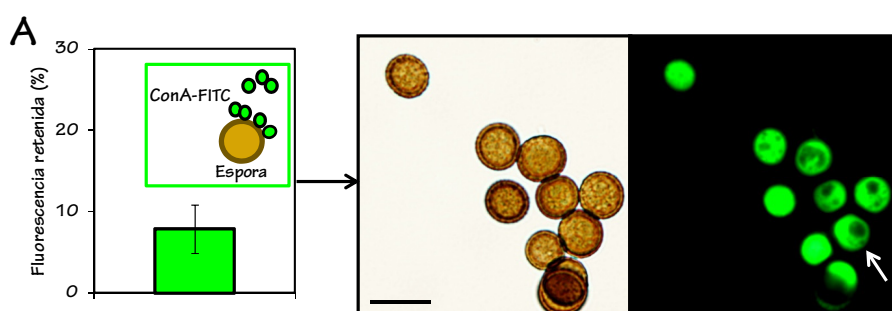
El desarrollo normal de las células de *S. scitamineum* se vio afectado por la presencia de ConA, lo cual demostró que ésta debía unirse a su ligando de pared en las teliosporas. A continuación, fueron realizados experimentos de desorción de la proteína de la superficie celular, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.1.1.1 (Ligamiento y desorción de Concanavalina A (ConA)-FITC a la pared de las teliosporas) de Material y Métodos. Para ello y en primer lugar, se procedió al marcaje de la lectina con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El porcentaje de ConA-FITC retenida sobre la pared celular se determinó mediante espectrofluorimetría a partir de la diferencia entre los niveles de fluorescencia en el sobrenadante antes y después de la incubación de la lectina con las teliosporas (Figura 56 A).

Tras la unión de la ConA-FITC a la pared de las teliosporas se observó que la

lectina no se distribuía de manera homogénea por toda la célula. En muchos casos aparecieron zonas libres de marcaje que podrían corresponderse con la localización del poro germinativo (Figura 56 A).

Posteriormente, las teliosporas fueron incubadas en presencia de a) metil manosa, b) glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 o c) glicoproteínas HMMG de plantas del mismo cv. inoculadas con el patógeno, para comprobar el poder de desorción que cada agente ejercía sobre la Con A retenida sobre la superficie celular. El azúcar produjo los mayores niveles de desorción de la ConA retenida (más de un 20%) (Figura 56 B). Sin embargo, resultó interesante que las glicoproteínas también produjeron desorción de la lectina retenida (aunque mucho menos que el azúcar), sugiriendo que alguna proteína contenida en las HMMG podría compartir ligando de pared en las células de *S. scitamineum* con la ConA.

Figura 56



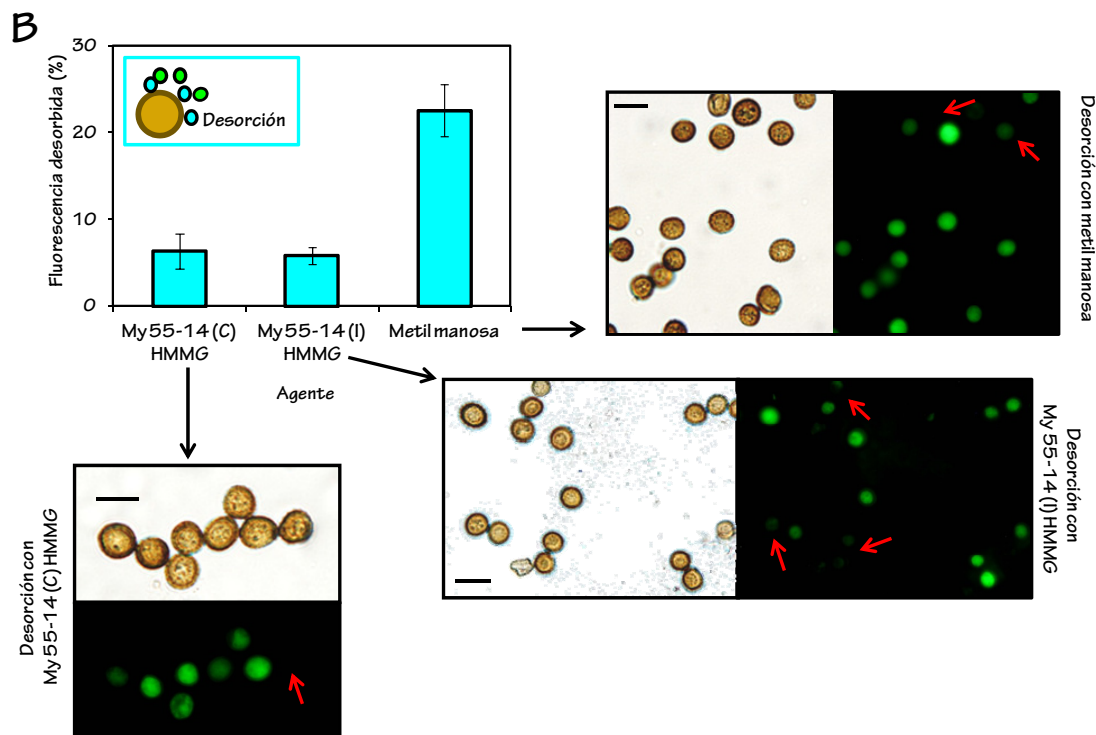


Figura 56. Porcentaje de ConA-FIT retenida en la pared de las teliosporas tras la incubación de las células en presencia de la lectina. En las imágenes de fluorescencia, obtenidas mediante microscopía óptica, las flechas blancas señalan las áreas no fluorescentes en las células (A). Porcentaje de fluorescencia desorbida a partir de las células marcadas con ConA tras el contacto con las glicoproteínas HMMG del cv. resistente (My 55-14) antes (C, control) o después de inocular (I, inoculado) y tras la incubación en presencia de metilmanosa. En las imágenes de fluorescencia, obtenidas mediante microscopía óptica, las flechas rojas señalan aquellas células que han perdido su fluorescencia, probablemente tras la incubación con el agente correspondiente (B).

3-EXISTENCIA DE UNA SEÑAL DE QUORUM SENSING PREVIA A LA INFECCIÓN EN LA POBLACIÓN FÚNGICA

La existencia de pequeñas aglutinaciones incluso en ausencia de glicoproteínas HMMG condujo a pensar que las células fúngicas desarrollaban, por sí mismas, algún tipo de proceso agregativo que pudiera ser beneficioso para la población. Por eso, se

procedió a analizar la naturaleza de las proteínas que las teliosporas liberan en las primeras etapas de su germinación (proteínas fúngicas o FP, *Fungal proteins*), obtenidas según se describe en el apartado 3.2 (*Obtención de proteínas fúngicas segregadas por las teliosporas durante su germinación*), sospechándose de composición similar a las HMMG de caña de azúcar.

3.1-SIMILITUDES ENTRE EL CONTENIDO DE LAS FP Y LAS HMMG

3.1.1-Existencia de arginasa en las FP

En primer lugar, la existencia de actividad arginasa fue valorada en las FP obtenidas tras tiempos variables de incubación durante las 6 primeras horas de germinación de las teliosporas en agua (Figura 57). La cantidad de proteínas producidas durante la germinación (A) incrementó con el tiempo de incubación, al mismo tiempo que la actividad arginasa liberada por las células en crecimiento (B). Esta última llegó a cuadruplicarse transcurridas las 6 h.

La arginasa fúngica fue semi-purificada del total de FP según describe el protocolo del apartado 3.4 (*Semi-purificación de arginasas contenidas en las glicoproteínas HMMG o en las FP*) de Material y Métodos. La fracción conteniendo mayor actividad arginasa para cada tiempo de incubación (1,5, 3, 4,5 y 6 h) fue elegida para posteriores ensayos. La Figura 58 muestra la actividad de cada fracción elegida.

Por otro lado, las FP fueron sometidas a separación electroforética por PAGE-SDS. El gel fue posteriormente teñido con nitrato de plata para la detección de las diferentes bandas proteicas, según describe el protocolo

desarrollado en el apartado 14.1 (*PAGE-SDS y posterior tinción con nitrato de plata*) de Material y Métodos. La imagen del gel tras la tinción se muestra en la Figura 59.

Figura 57

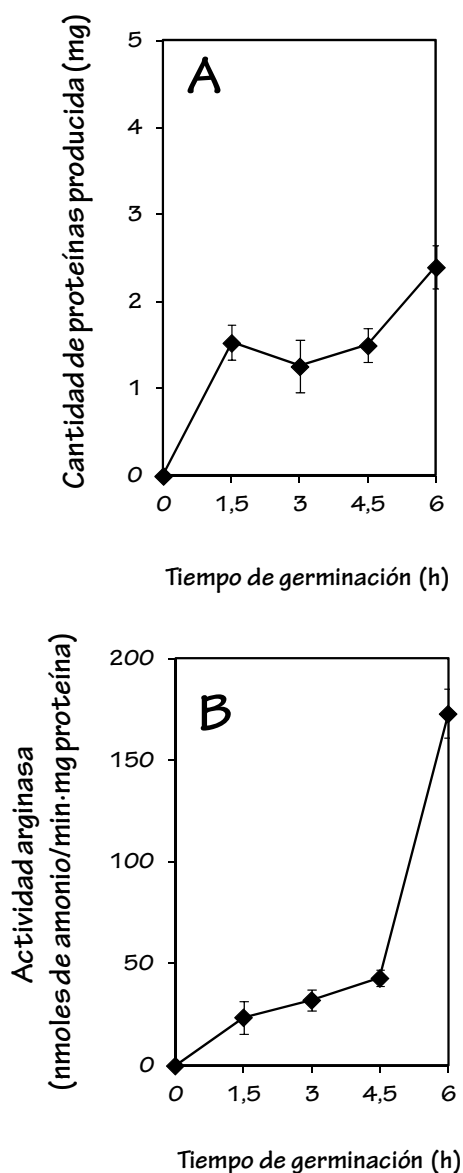


Figura 57. Cantidad de proteínas (A) y actividad arginasa (B) contenidas en las FP producidas por las teliosporas durante tiempos variables de germinación (1,5, 3, 4,5 y 6 h). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

Figura 58

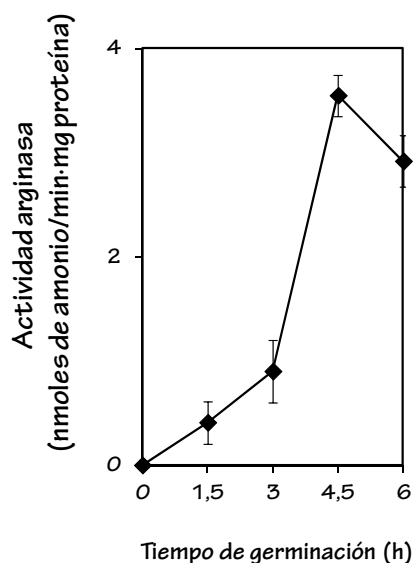


Figura 58. Actividad arginasa de la fracción que contenía mayor actividad tras el proceso de semi-purificación de la enzima a partir de las FP producidas por las teliosporas durante tiempos variables de germinación (1,5, 3, 4,5 y 6 h). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

Fue interesante encontrar dos bandas, de 85 y 100 kDa, idénticas a las obtenidas para la migración de SCA pre-purificada de la fracción HMMG (ver Figura 42). De esta manera, las bandas de 85 y 100 kDa se identificaron como las correspondientes a la arginasa fúngica. Por otro lado, resultó sorprendente visualizar tan pocas bandas proteicas tras el revelado. Apenas otras dos bandas (de aproximadamente 54 y 42 kDa) y algunas otras de menor tamaño (mayor movilidad electroforética) y menor nitidez fueron detectadas tras la tinción. A la vista de estos resultados se determinó que la

arginasa podría ser una proteína predominante durante las primeras etapas de la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum*.

Figura 59

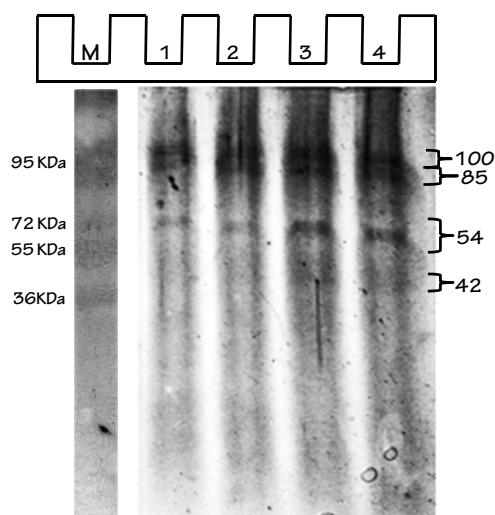


Figura 59. PAGE-SDS y tinción posterior con nitrato de plata de las FP segregadas por las células de *S. scitamineum* a distintos tiempos de incubación. M, marcador de pesos moleculares; 1, FP producidas durante 1,5 h de germinación; 2, FP producidas durante 3 h de germinación; 3, FP producidas durante 4,5 h de germinación; 4, FP producidas durante 6 h de germinación.

Tras confirmar la presencia de actividad arginasa, se analizó también la existencia de actividad quimioattractante y aglutinante en las proteínas producidas por las teliosporas durante su germinación, buscando similitudes con el contenido de las HMMG. La actividad arginasa obtenida a partir del total de FP fue ensayada para su valoración como agente quimioattractante y/o citoaglutinante.

3.1.2-Actividad quimioattractante en las FP

Los experimentos de quimiotaxis en presencia de FP producidas tras los distintos tiempos de incubación mostraron que todas tenían efecto quimioattractante sobre las células fúngicas (Figura 60).

Figura 60

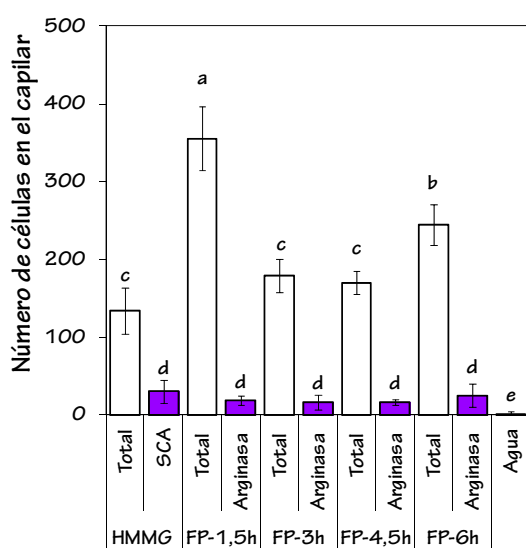


Figura 60. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta FP producidas durante 1,5, 3, 4,5 y 6 h de germinación (en blanco) o arginasa semi-purificada a partir de las distintas FP (en morado). Los resultados correspondientes al efecto quimioattractante ejercido por las glicoproteínas HMMG y por la SCA de plantas control del cv. My 55-14 han sido añadidos para comparar los resultados de ambos ensayos. Un control, conteniendo agua en el capilar fue realizado (en negro en la Figura). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

El mayor efecto quimiotáctico fue observado en presencia de las FP producidas tras 1,5 h comenzar la incubación de las teliosporas en medio acuoso. Si se compara el efecto quimioattractante de las FP con el ejercido por las glicoproteínas HMMG se observa que aquellas son capaces de desplazar a un mayor número de teliosporas hacia el capilar, sobre todo las producidas tras tiempos cortos de incubación (1,5 h). Por otra parte, se comprobó que, al igual que ocurría con las glicoproteínas de caña, las arginasas aisladas a partir de las distintas FP en ningún caso estimularon la quimioatracción de las células fúngicas.

3.1.3-Actividad degradativa en las FP

De igual manera que se detectó actividad degradativa (quitinasa, β -1,3-glucasa y β -1,4-glucasa) en el conjunto de las glicoproteínas HMMG, y viendo que ésta era modificada en presencia del patógeno, se valoró la misma en las células fúngicas en ausencia o presencia de las glicoproteínas (Figura 61).

En ausencia de HMMG, las teliosporas manifestaban actividad degradativa correspondiente a las tres enzimas analizadas. La producción de estas enzimas durante el desarrollo del hongo está comúnmente relacionada con la necesidad de degradación de la pared

vegetal durante la colonización del patógeno (Que *et al.*, 2014b). Sin embargo, tras la incubación en presencia de las glicoproteínas HMMG, el patrón de producción de estas enzimas por las teliosporas fue modificado. Desapareció la actividad quitinasa y β -1,4-glucanasa en las células fúngicas y los niveles de actividad β -1,3-glucanasa incrementaron un 30%.

Figura 61

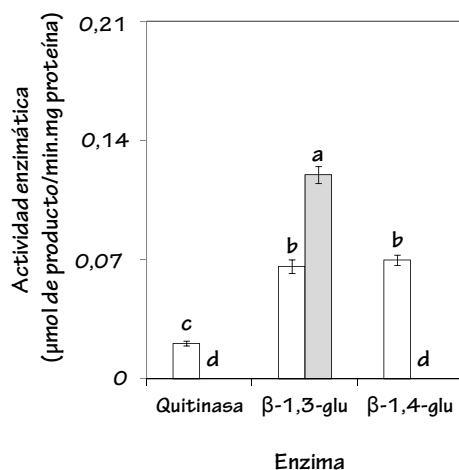


Figura 61. Niveles de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa (β -1,3-glu) y β -1,4-glucanasa (β -1,4-glu) contenidas en las células fúngicas antes (en blanco) y después (en gris) del contacto con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.1.4-Capacidad aglutinante de las FP

Siguiendo el protocolo detallado en el apartado 11 (*Ensayos de citoaglutinación*) de

Material y Métodos fueron realizados experimentos de citoaglutinación en presencia de FP producidas por las teliosporas durante 6 h de germinación y en presencia de las arginasas fúngicas semi-purificada de ese mismo conjunto de proteínas segregadas (Figura 62).

Figura 62

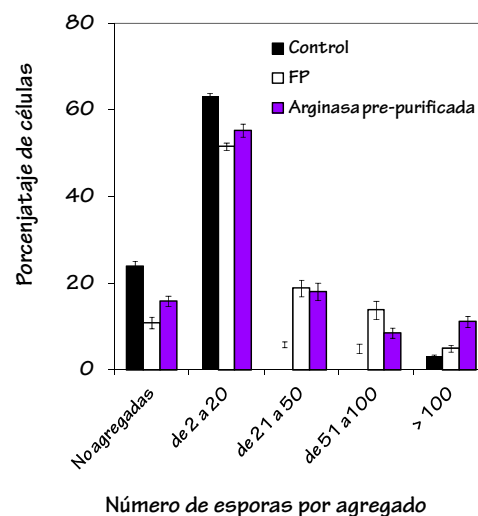


Figura 62. Ensayo de citoaglutinación en presencia de FP producidas tras 6 h de germinación (en blanco) y de arginasa fúngica semi-purificada (en morado). Un control, en ausencia de cualquier proteína fúngica fue incorporado (en negro). Los resultados se expresan como porcentaje de células implicadas en cada una de las distintas agrupaciones (teliosporas no agregadas, agregadas en grupos de 2 a 20 células, en grupos de 21 a 50 células, en grupos de 51 a 100 células o en grupos de más de 100 células). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

En ambas situaciones incrementó el tamaño de los grupos de teliosporas en

relación al control, a la vez que disminuyó la proporción de células dispersas o implicadas en la formación de grupos pequeños de células, de la misma forma que ocurría en presencia de las glicoproteínas HMMG de las plantas no inoculadas del cv. My 55-14 y de la SCA semi-purificada a partir de éstas (Figura 52).

3.2-LAS FP Y LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG: SEÑAL DE QUÓRUM O DE FALSO QUÓRUM

El sorprendente parecido encontrado entre la composición de las FP y la composición de las glicoproteínas HMMG hizo sospechar que la producción de estas últimas por parte de la caña formaba parte de un mecanismo de defensa de la planta contra la infección basado en la simulación de un ambiente que atrajera al patógeno.

Tras conocer cómo ambas proteínas estimulan la quimioatracción y la citoaglutinación de las teliosporas, se quiso comprobar si el desenlace iniciado por las glicoproteínas de defensa de la caña era diferente al iniciado por las FP. Por ello, se analizó cómo afectaban unas y otras proteínas a la germinación de las células fúngicas, siguiendo para ello el protocolo descrito en el apartado 13.1 (*Ensayos de germinación en agar 0,1% (p/v)*) de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 63.

Figura 63

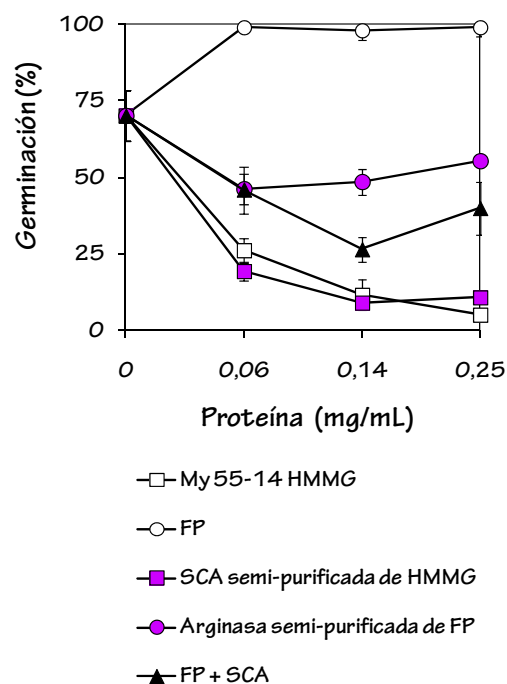


Figura 63. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes (0,06-0,25 mg·mL⁻¹) de HMMG de plantas control del cv. My 55-14 (□), de FP producidas durante 6 h de germinación (○), de SCA (■), de arginasa fúngica (●), y, por último, en presencia de una mezcla equimolecular de FP y SCA (▲). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

En ausencia de proteínas, alrededor de un 72% de teliosporas habían germinado tras las 15 h del ensayo. La incubación en presencia de FP estimuló eficazmente la germinación de las células fúngicas desde las más bajas concentraciones (Figura 63, Figura 64 A). Por el contrario, las incubaciones en presencia de glicoproteínas

HMMG producidas por el cv. resistente y de SCA semi-purificada a partir de las HMMG hicieron disminuir significativamente el porcentaje de germinación de las teliosporas hasta valores menores del 25% (Figura 64 B).

Figura 64

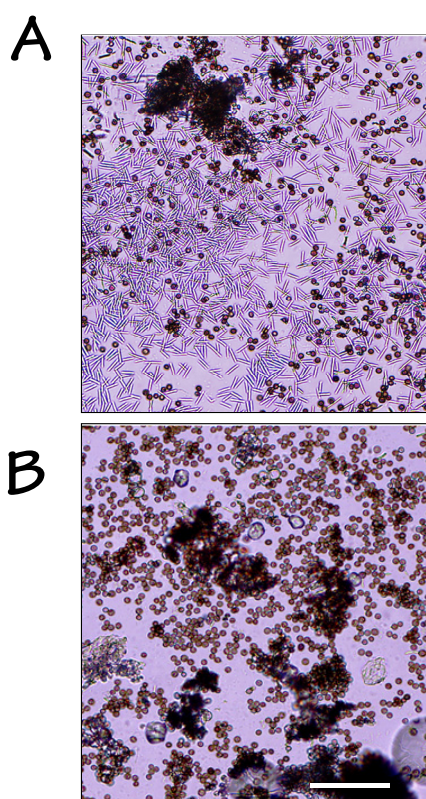


Figura 64. Micrografías en campo claro obtenidas por microscopía óptica que muestran las diferencias observadas en la germinación de las teliosporas en presencia de FP $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, donde la germinación alcanzada fue del 100%, (A), y en presencia de HMMG de plantas control del cv. My 55-14, donde la germinación disminuyó hasta valores mínimos (B). Las barras de escala indican $100 \mu\text{m}$. Las flechas señalan la presencia abundante de esporidios en el medio de incubación tras la incubación con las FP.

Cuando se añadieron conjuntamente al medio de incubación el segregado de FP y la SCA, se observó una posible competencia entre ambos tipos de proteínas, ya que los valores obtenidos en relación al porcentaje de germinación fueron valores intermedios a los resultantes en presencia de ambos tipos de proteínas por separado. Así, se supuso que la arginasa de origen fúngico podría ser la responsable de esta competencia. Ambas arginasas podrían compartir el mismo ligando de pared en la superficie de las teliosporas.

Resultó interesante que la arginasa aislada del total de FP, a diferencia de la SCA, no inhibió la germinación de las teliosporas (Figura 63). Sin embargo, en presencia de la arginasa aislada, el porcentaje de germinación alcanzado no fue equiparable al alcanzado en presencia del total de FP.

Con estos resultados se confirmó que el segregado fúngico y las glicoproteínas HMMG producían efectos contrarios sobre las etapas iniciales del desarrollo del patógeno, a pesar de inducir ambas la quimioatracción y la citoaglutinación de las células. Mientras que las proteínas fúngicas estimulan la germinación del grupo (Figura 64 A) y la ramificación de las teliosporas durante su germinación (Figura 65), las glicoproteínas de defensa de la planta bloquean la germinación de las células

(Figura 64 B), siendo la SCA la enzima responsable de esta inhibición (Figura 63).

Figura 65

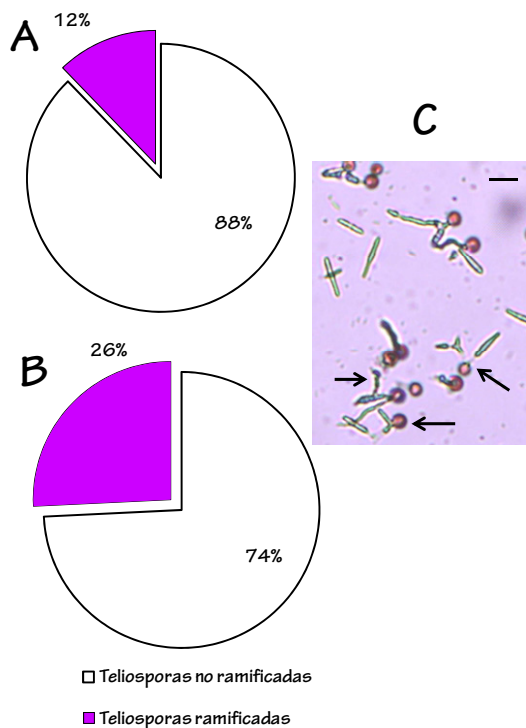


Figura 65. Porcentaje de teliosporas ramificadas en ausencia (A) o en presencia (B) del total de FP liberadas durante las 6 primeras horas de germinación. Micrografía en campo claro obtenidas por microscopía óptica que muestran las ramificaciones encontradas tras la incubación en presencia de las FP. Las flechas señalan las ramificaciones. La barra de escala indica 10 µm (C).

El nivel de competencia entre las arginasas se analizó en presencia de las diferentes FP obtenidas. En la Figura 66 se observa el porcentaje de germinación en presencia de una concentración 0,14 mg·mL⁻¹ del total de FP producidas a

diferentes tiempos de germinación (en morado en la Figura).

Figura 66

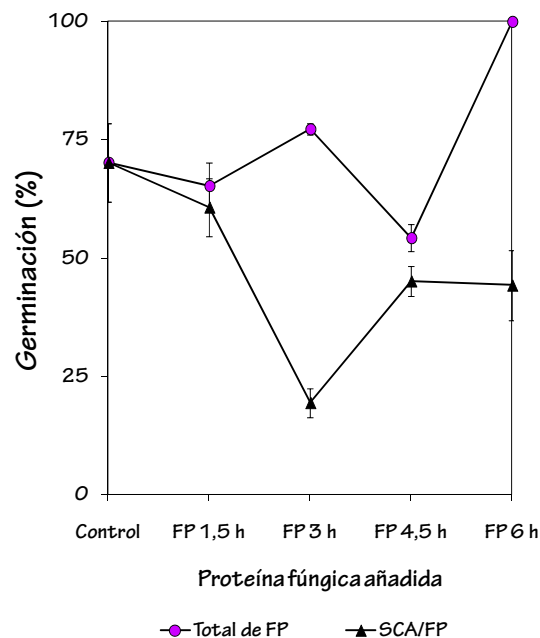


Figura 66. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de una concentración 0,14 mg·mL⁻¹ de FP obtenidas tras distintos tiempos de germinación. El ensayo fue llevado a cabo en ausencia (●) o en presencia (▲) de SCA en el mismo medio de incubación (mezcla equimolecular). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

A pesar de que la actividad arginasa contenida en el total de FP incrementaba ininterrumpidamente a lo largo de la germinación (Figura 57 B), el porcentaje de germinación de las teliosporas en presencia de las distintas proteínas no aumentó de

manera lineal (Figura 66). Sorprendió que el segregado fúngico liberado a las 3 h y a las 6h estimulara la germinación, alcanzando con este último niveles del 100%, mientras que los segregados producidos a las 1,5 h y las 4,5 h no lo consiguieron (Figura 66).

El efecto de las mismas proteínas sobre la germinación fue analizado tras la adición conjunta de SCA, con el fin de analizar el nivel de competencia de la enzima con los componentes del total de FP. La SCA únicamente ejerció un efecto negativo sobre la germinación cuando fue añadida al medio de incubación que contenía las FP producidas a las 3 y a las 6 h, justamente las que poseían capacidad estimulante de la germinación.

4-COMPETENCIA ENTRE LA SCA Y LA ARGINASA FÚNGICA

Tras conocer la existencia de actividad arginasa en el total de proteína fúngica, responsable de la citoaglutinación y la señal de quórum de las teliosporas de *S. scitamineum*, experimentos de competencia entre la SCA y la arginasa de origen fúngico, contenida en las FP, fueron realizados con el fin de discernir cuál era el efecto de cada una de ellas en la interacción planta-patógeno.

Para ello, se utilizó la SCA semi-purificada y el total de FP producido durante las 6 primeras horas de la germinación. Sospechando que una pérdida de actividad arginasa durante el proceso de purificación de la enzima fúngica podría afectar a su funcionalidad biológica, los experimentos de competencia fueron llevados siempre a cabo en presencia del total de FP pero conteniendo la enzima activa o inactivada con HgSO_4 , obtenida según el protocolo descrito en el apartado 3.3 (*Obtención de FP conteniendo arginasa inactivada*).

El HgSO_4 inhibió la actividad arginasa contenida en el total de proteína segregada (Tabla IX). La inactivación permitió estudiar el papel que la arginasa fúngica desempeña en el desarrollo de las teliosporas sin tener que semi-purificarla previamente, evitando así la pérdida de actividad durante el proceso. Dos inactivaciones sucesivas en presencia de HgSO_4 fueron necesarias para eliminar toda la actividad arginasa contenida en el total de proteínas fúngicas. La primera de ellas eliminó el 80% de la actividad y la segunda, la actividad restante (20%). Las distintas proteínas obtenidas, que diferían en su nivel de actividad arginasa, fueron utilizadas en los experimentos de competencia.

Tabla IX

	Procedente de SCA	Procedente de las FP	Procedente de las FP e inactivada con HgSO_4 5mM 1,0 h (1ª incubación)	Procedente de las FP e inactivada con HgSO_4 10mM 2 h (2ª incubación)
Actividad arginasa (nmoles de amonio·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	18,03±2,1	173,03±9,31	32,5±4,3	0

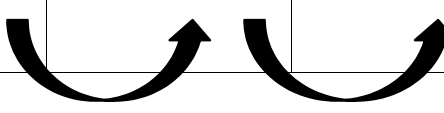


Tabla IX. Niveles de actividad arginasa utilizados en los experimentos de competencia entre las diferentes formas de arginasa. Se muestran los valores de actividad inicial de la SCA semi-purificada, así como de la arginasa fúngica contenida en las FP 6h. Esta última fue inactivada en presencia de Hg^{2+} , haciendo falta dos incubaciones para lograr la inactivación completa de la actividad enzimática.

4.1-AFINIDAD DE LAS DISTINTAS ARGINASAS POR SU LIGANDO DE PARED EN LAS TELIOSPORAS: EXPERIMENTOS DE UNIÓN Y DESORCIÓN

Los experimentos de unión y desorción de arginasa marcada a la pared celular de las teliosporas fueron realizados según describe el apartado 12.1.1.3 (Ligamiento y desorción de AFA, IFA y SCA a la pared de las teliosporas) de Material y Métodos en presencia de FP 6h conteniendo arginasa activa (AFA) o inactivada (IFA), y en presencia de la arginasa producida por la caña de azúcar (SCA). Tras el marcaje fluorescente de cada proteína con FITC (*), la absorbancia retenida en la pared de fúngica fue valorada como porcentaje de fluorescencia que desapareció del medio

tras la incubación de las células con cada proteína (Figura 67 a). Aproximadamente un 75% de AFA marcada fue retenida en la pared de las teliosporas mientras que un 55% de IFA y únicamente un 10% de SCA desapareció del medio de incubación.

Además de cuantificar la fluorescencia en el sobrenadante, fueron tomadas micrografías de las células marcadas tras las distintas incubaciones. Sorprendentemente, aunque más cantidad de AFA se unió a la pared fúngica, ésta lo hizo sobre un menor número de esporas que la SCA (Figura 67 b), la cual se unió a cerca de un 90% del total de células fúngicas. Esto último se refleja en la Figura 67 c y d, donde puede verse la proporción de marcaje

en dos grupos de teliosporas, en función de si la proteína añadida fue AFA* o SCA*.

Figura 67

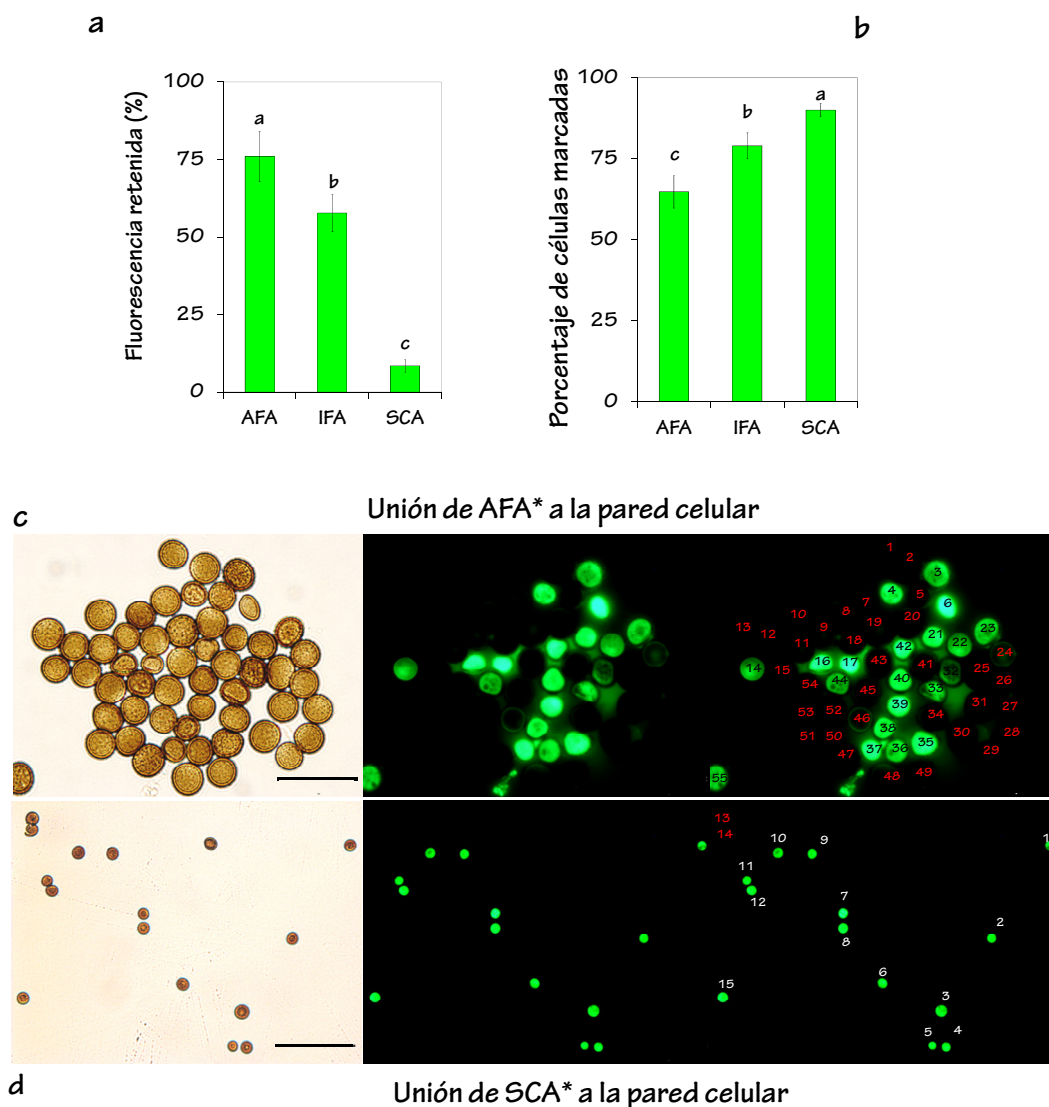


Figura 67. Porcentaje de fluorescencia retenida sobre la pared de las teliosporas tras la incubación con las proteínas AFA, IFA o SCA marcadas con FITC (a). Porcentaje de células que presentaban fluorescencia en su pared celular tras la incubación con las mismas proteínas (b). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$). Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia que muestran un grupo de teliosporas previamente incubadas en presencia de las proteínas AFA (c) o SCA (d) marcadas con FITC (*). Se muestra la imagen en campo claro con su correspondiente en fluorescencia. En ésta son señaladas las esporas que presentaron (numeración en negro/blanco) o no (numeración en rojo) fluorescencia tras la incubación. Las barras de escala indican 20 μm y 50 μm en (c) y (d), respectivamente.

A continuación, tras sucesivos lavados para garantizar la eliminación de la fluorescencia residual no ligada a las paredes, las células, reteniendo cada uno de los tres tipos de proteínas, fueron incubadas en presencia de los otros dos tipos de arginasas, con el fin de comprobar la capacidad de desorción de cada proteína sobre las otras dos (Figura 68).

Figura 68

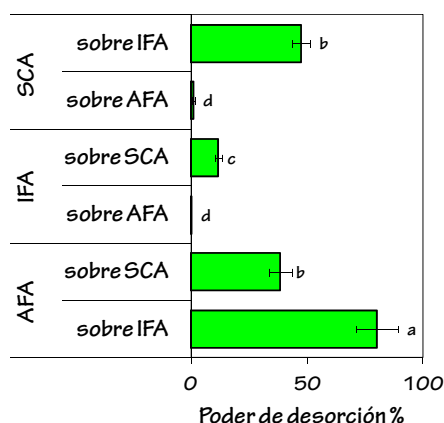


Figura 68. Poder de desorción ejercido por las distintas arginasas sobre las otras dos. Los resultados son expresados como porcentaje de fluorescencia, previamente retenida sobre la pared, liberada al medio tras la incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

La SCA pudo desorber el 50% de la IFA previamente retenida sobre la pared de las teliosporas (Figura 68), mientras que no pudo movilizar a la enzima si esta se encontraba en su configuración activa (AFA). Esta última, por el contrario, mostró

poseer una gran capacidad de desorción sobre las otras dos enzimas, sobre todo sobre sí misma en forma inactiva o IFA (> 75%). IFA desorbió únicamente un 10% de SCA y nada de AFA.

4.2-NIVEL DE ACTIVIDAD ARGINASA QUE ESTIMULA LA GERMINACIÓN

Experimentos de germinación fueron repetidos en presencia de las distintas arginasas (AFA, IFA, SCA) con el fin de comprobar si el nivel de actividad está relacionado con la estimulación de la germinación de las teliosporas (Figura 69).

Figura 69

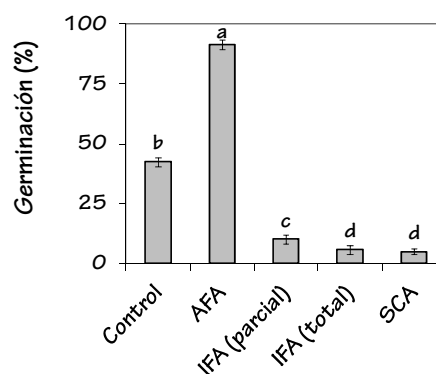


Figura 69. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de AFA, IFA, parcial o totalmente inactivada, o SCA. Un control incubado en ausencia de arginasas fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

Mientras que las FP conteniendo arginasa activa (AFA) provocaron un incremento en los niveles de germinación de casi un 100%. con respecto al control, la misma proteína en su configuración inactiva (IFA) y la SCA, no solo no estimularon la germinación, sino que la inhibieron patentemente tras 15 h de incubación.

La distribución de las proteínas marcadas sobre la pared de las teliosporas fue observada por microscopía óptica de fluorescencia tras largos tiempos de incubación. Las imágenes mostradas en la Figura 70 corresponden a la localización sobre las teliosporas de las FP conteniendo arginasa inactivada, IFA, (A y B) o activa, AFA (C, D, E) tras 96 h de incubación.

Se observó una morfología alterada en las teliosporas que trataban de germinar, infructuosamente, en presencia de IFA (Figura 70 A y B). Éstas presentaban un ensanchamiento en la base de la hifas, las cuales a su vez se visualizaban de menor tamaño, y su fluorescencia se distribuía irregularmente sobre la superficie celular (B). La unión las FP conteniendo la arginasa en su conformación activa (AFA) mostró una distribución más homogénea, aunque polarizada en algunas células (C, D, E). En las hifas en crecimiento las proteínas se localizaron mayoritariamente en los puntos de conexión entre las distintas células en división (D), al mismo tiempo que su

retención desaparecía de la superficie de la teliospora.

Figura 70

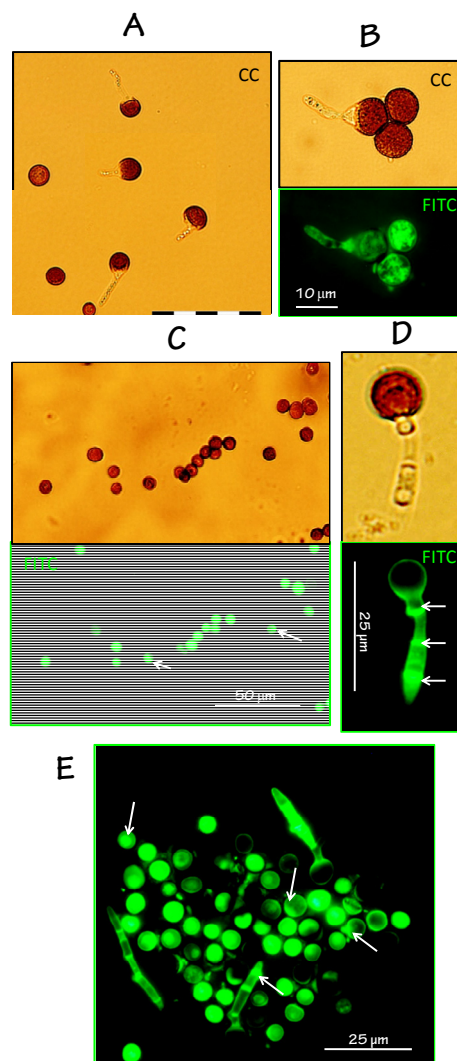


Figura 70. Micrografías en campo claro (CC) y fluorescencia (FITC) obtenidas por microscopía óptica correspondientes a la localización de las proteínas IFA (A, B) o AFA (C, D, E) retenidas sobre la pared de las teliosporas de *S. scitamineum* tras 96 h de incubación. Las flechas rojas indican la presencia de ensanchamientos en la base de las hifas emergentes en presencia de IFA. Las flechas blancas señalan células con una distribución polarizada de AFA sobre la superficie celular.

5-LA ACTINA Y LA MIOSINA EN LAS TELIOSPORAS DE *S. scitamineum*

5.1-SOSPECHA DE SU IMPLICACIÓN EN LA MOTILIDAD DE LAS TELIOSPORAS

Con objeto de comprobar si la organización del citoesqueleto estaba implicada en el desplazamiento de las células de *S. scitamineum*, se realizaron diferentes tipos de ensayos y observaciones.

5.1.1-Ausencia de estructuras externas implicadas en la motilidad

Sospechando que el citoesqueleto pudiera ser responsable de la motilidad de las células fúngicas, se pretendió descartar, mediante la visualización por microscopía electrónica, la existencia de estructuras externas implicadas en el desplazamiento de las teliosporas durante la quimiotaxis.

Las imágenes obtenidas por TEM a partir de teliosporas que se habían desplazado por quimiotaxis no mostraron la presencia de estructuras celulares que pudieran relacionarse con su movilidad (Figura 71). Se tomaron micrografías ampliadas de algunas zonas de la pared celular que confirmaran la ausencia de estructuras externas con capacidad inductora de movimiento (Figura 71 b). Sí se apreció la presencia de unas pequeñas espículas superficiales no vibrátiles (Figura 71 b y c), una gruesa pared celular (Figura

71 a, b y c) y la existencia de invaginaciones en uno de los polos celulares en algunas de las teliosporas observadas (Figura 71 a y c). El citoplasma mostraba gránulos o bien concentrados (Figura 71 a), o bien dispersos en el citoplasma (Figura 71 c).

Figura 71

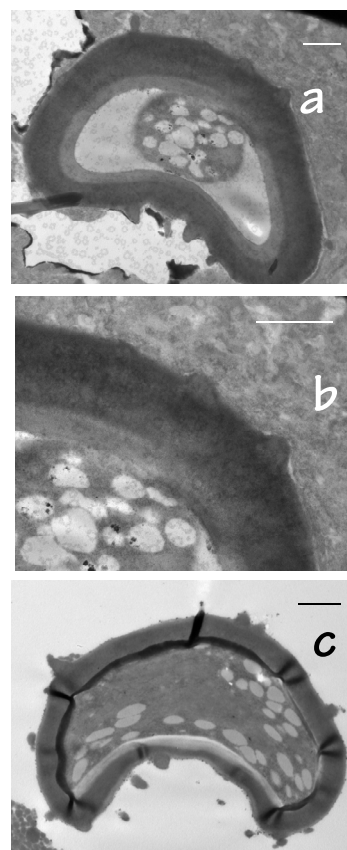


Figura 71. Micrografías obtenidas por TEM de teliosporas de *S. scitamineum* recogidas del capilar tras los experimentos de quimioatracción en presencia de glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 como agente quimioattractante. Se muestra la estructura de teliosporas invaginadas (a y c). En b, ampliación de a, se corrobora la ausencia de estructuras móviles sobre la superficie celular, siendo apreciables unas pequeñas espículas. Las barras de escala indican 1,0 μ m.

Las imágenes por SEM proporcionaron información acerca de la morfología de las teliosporas de *S. scitamineum* que habían sido desplazadas hacia el capilar por quimiotaxis (Figura 72). En todos los casos destacó la ausencia de estructuras externas que pudieran ser relacionadas con la producción de movimiento en las células. De nuevo pudieron

ser visualizadas pequeñas espículas en la superficie.

Fue interesante observar la presencia de invaginaciones en muchas de las células recogidas en el capilar (Figura 72 a), donde alguna teliospora había conseguido incluso germinar (Figura 72 b). Muchas de las células observadas se encontraban aglutinadas (Figura 72 c y d).

Figura 72

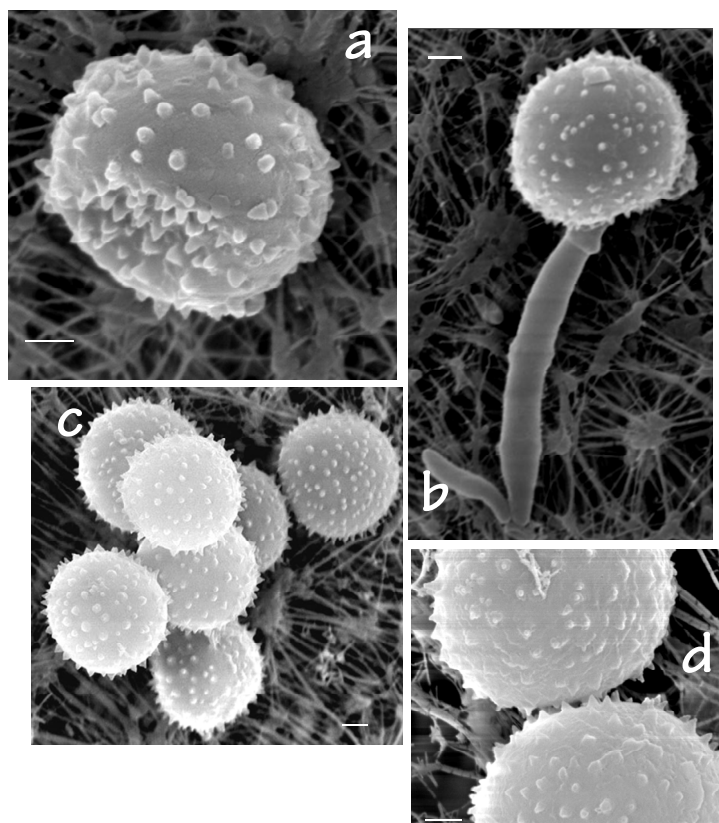


Figura 72. Micrografías obtenidas por SEM de teliosporas de *S. scitamineum* recogidas del capilar tras los experimentos de quimioatracción en presencia de glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 como agente quimioattractante. Se muestra una espora invaginada (a), una teliospora germinando (b), un grupo de teliosporas aglutinadas en el capilar tras la quimioatracción (c) y una ampliación de la zona de contacto entre dos células, en las cuales puede observarse la ausencia de estructuras móviles en la pared celular. En todos los casos, las barras de error indican 1,0 μm .

5.1.2-Experimentos de quimioatracción en presencia de inhibidores de la funcionalidad de la actina y la miosina

En base a lo observado durante la quimiotaxis de otros sistemas fúngicos, como las zoosporas de *Aphanomyces cochlioides* (Islam, 2008) y tras confirmar la ausencia de estructuras motiles externas en las teliosporas del carbón (Figura 71 y 72), se pensó, como hipótesis explicativa del movimiento, que el citoesqueleto de actina, en colaboración con la miosina, podría ser el agente implicado en el movimiento de las células fúngicas. Para demostrar este hecho se repitieron los experimentos de quimioatracción en presencia de inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto, para comprobar si entonces el patrón quimiotáctico se veía alterado (Figura 73).

El método Sjobland *et al.* (1978), con modificaciones, fue elegido de nuevo para este estudio, utilizando como quimioattractante glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas de los cvs. sensible (Figura 73 a) y resistente (Figura 73 b) y realizando el conteo de esporas en el capilar 5 h después del inicio del experimento, ya que se conocía que era el tiempo de ensayo que garantizaba una mayor entrada de esporas en los capilares.

Figura 73

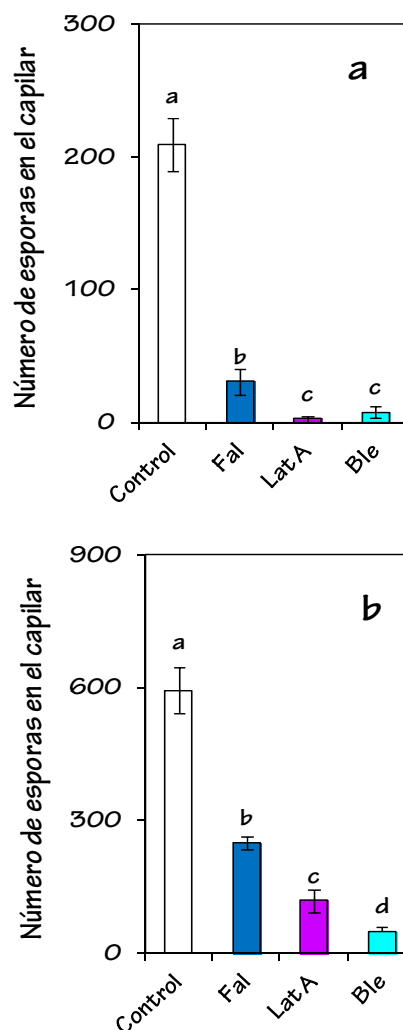


Figura 73. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de plantas control de B 42231 (a) o My 55-14 (b). Donde se indica, Fal 0,13 µM, Lat A 5 µM o Ble 13 µM fueron añadidos al medio de incubación. Un control en ausencia de inhibidores fue incorporado al ensayo. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Además, se incorporaron al medio los siguientes agentes inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto: Faloidina (Fal), estabilizante del citoesqueleto de actina (Cooper, 1987), Latrunculina A (Lat A), agente que mantiene a la actina despolimerizada (Kazami et al., 2011) y Blebistatina (Ble), agente inhibidor de la contractilidad de la miosina II no muscular (Kovacs et al., 2004).

Las tres drogas, en relación al control incubado en ausencia de cualquier inhibidor, impidieron el desplazamiento de las teliosporas hacia el capilar a pesar de que éste contenía glicoproteínas HMMG como quimioattractante (Figura 73). Estos resultados sugirieron que el citoesqueleto fúngico estaba implicado en la generación del movimiento. Además, su reorganización en las células debía responder a una señal interna generada tras la unión de la glicoproteína quimioattractante de caña a su ligando de pared en las teliosporas.

Las Figura 74 y 75 muestran los resultados correspondientes al ensayo de quimioatracción repetido en presencia de los mismos inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto, pero añadiendo, donde se indique, GTP, GTP γ S o GDP β S al medio de incubación. Estas dos últimas moléculas alteran la actividad normal de las proteínas GTPasas: el GTP γ S, un análogo del GTP no hidrolizable, mantiene a la proteína GTPasa

activada (Strange, 2010) y el GDP β S es un desactivador de las proteínas RhoGTPasas (Peterson et al., 1999). Si las proteínas GTPasas estuviesen implicadas en la reorganización del citoesqueleto de las teliosporas, la adición de estas moléculas al medio de incubación debería afectar a su desplazamiento quimiotáctico.

Figura 74

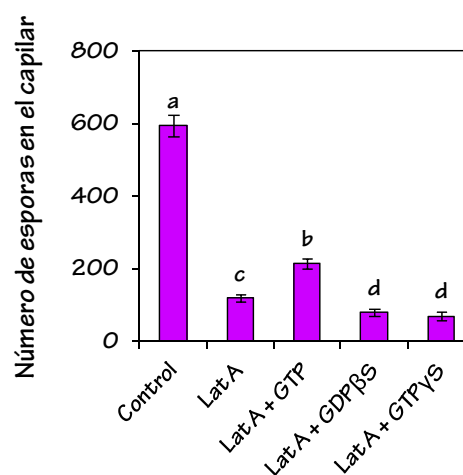


Figura 74. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de plantas control de My 55-14. Donde se indica, Lat A 5 μ M, GDP β S 5 mM, GTP 50 mM o GTP γ S 22 mM fueron añadidos al medio de incubación. Un control en ausencia de inhibidores fue incorporado al ensayo. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

De nuevo, la adición de Lat A al medio de incubación redujo la motilidad de las teliosporas, a un 20% en comparación con el control (Figura 74). El suplemento de GTP al medio incrementó la motilidad residual a un

36% mientras que ni el GTP γ S ni el GDP β S tuvieron efecto sobre la recuperación de la quimiotaxis.

Figura 75

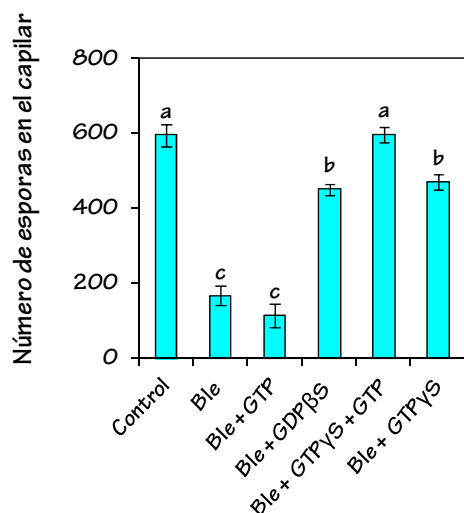


Figura 75. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta glicoproteínas HMMG de plantas control de My 55-14. Donde se indica, Ble 13 μ M, GDP β S 5 mM, GTP 50 mM o GTP γ S 22 mM fueron añadidos al medio de incubación. Un control en ausencia de inhibidores fue incorporado al ensayo. Las barras verticales indican el EE y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Más de un 30% del movimiento fue también inhibido por la incubación de las teliosporas con Ble 13 μ M en presencia de Fal, que fue añadida con el fin de mantener la F-actina polimerizada. Sin embargo, la motilidad no fue recuperada con la adición de GTP. El uso de GTP γ S o GDP β S produjo una recuperación de un 80% de la motilidad

mientras que la adición simultánea de GTP y GTP γ S permitió la recuperación total de la capacidad de movimiento.

Los resultados obtenidos sugieren que durante el proceso quimiotáctico de las teliosporas es necesaria la correcta funcionalidad de una proteína sensible a la Lat A (probablemente, actina) y otra sensible a la Ble, similar a la miosina (II) no muscular, presente en otros organismos eucariotas. La actividad de estas proteínas parece estar regulada por rutas de señalización que involucran a las proteínas GTPasas.

5.2-IMPLICACIÓN DE LA ACTINA Y LA MIOSINA EN LA GERMINACIÓN DE LAS TELIOSPORAS

Experimentos de germinación en presencia de inhibidores de la funcionalidad de la actina y la miosina fueron llevados a cabo para comprobar si ambas proteínas- o proteínas de naturaleza similar-ejercían un papel relevante en los primeros estadios de desarrollo del patógeno (Figuras 76 y 77).

Para ello, se cuantificó el porcentaje de germinación de las células de *S. scitamineum* a lo largo de 18 h de ensayo (Figura 76 a) en presencia de Lat A, Ble y Fal. Por otro lado, las teliosporas fueron incubadas en distintas concentraciones de cada inhibidor (Figura 76 b, c y d).

Figura 76

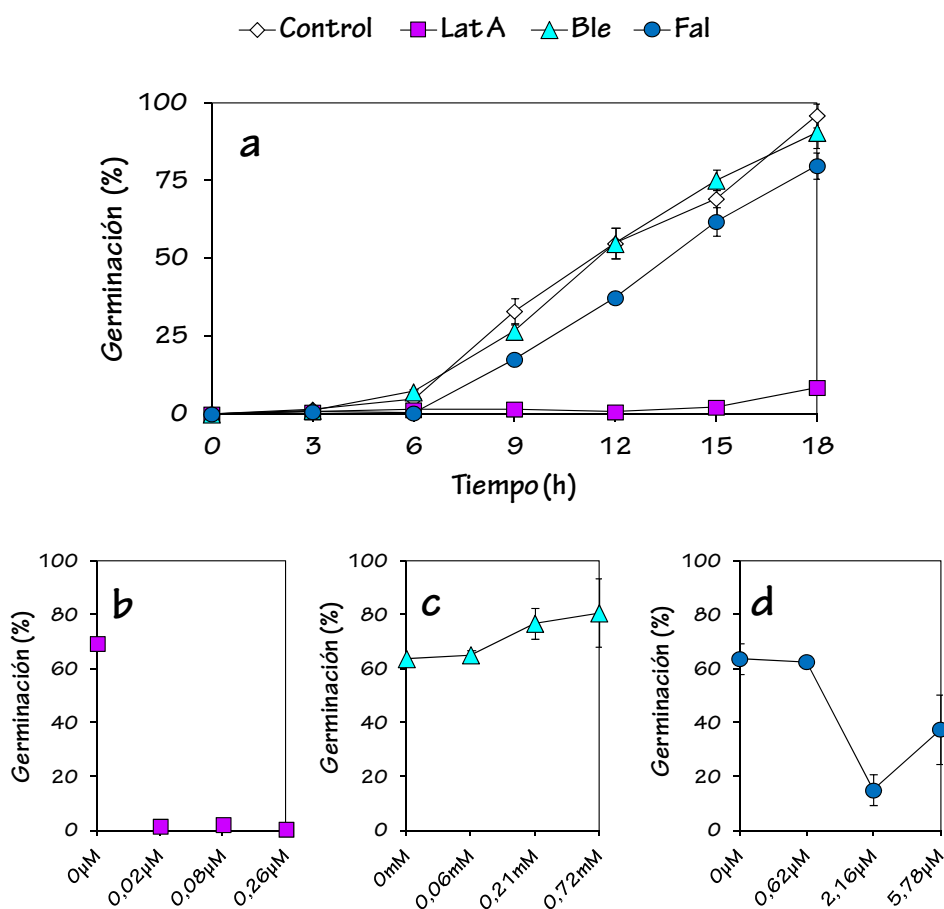


Figura 76. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto (Lat A, Ble o Fal). Un control, correspondiente a teliosporas incubadas en agua fue incluido. El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) a lo largo de 18 h de incubación (a). Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes de Lat A (b), Ble (c) o Fal (d). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

Lat A resultó ser el agente que ejercía un mayor efecto sobre la germinación de las teliosporas, inhibiéndola completamente desde concentraciones bajas y tiempos cortos (Figura 76 a y b). Fal también redujo los niveles de germinación, ejerciendo un máximo efecto a una concentración de 2,16

μM (Figura 76 d). Los resultados en el porcentaje de germinación de teliosporas tras su incubación con los inhibidores a lo largo de 18 h de ensayo demostraron que en presencia de Fal los niveles de germinación disminuían en relación al control pero aún así incrementaban con el tiempo, lo cual no

ocurría en presencia de la Lat A (Figura 76 a).

Cuando las teliosporas se incubaron en presencia de Ble, por el contrario, éstas germinaron e, incluso, se observó un ligero incremento en el porcentaje de germinación

a concentraciones altas del inhibidor (Figura 76 c). Resultó interesante, además, que en presencia de Ble muchas células desarrollaran largas y estrechas hifas (Figura 77 d y e) muy diferentes a las encontradas en las muestras control (Figura 77 a).

Figura 77

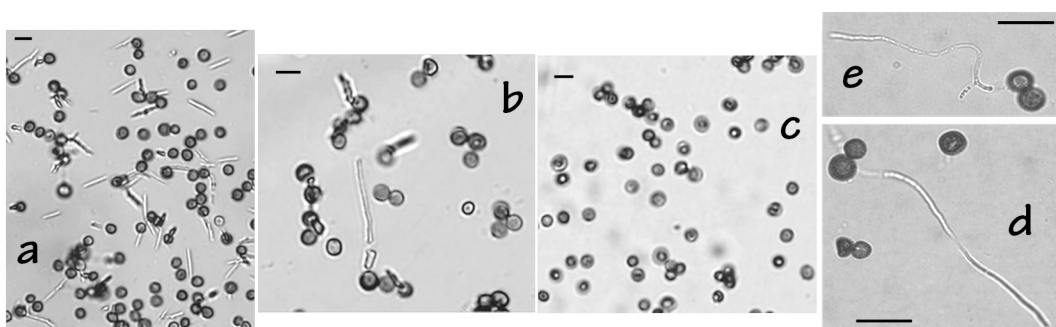


Figura 77. Micrografías en campo claro obtenidas mediante microscopía óptica que muestran algunas de las imágenes visualizadas durante la germinación de las teliosporas en ausencia y presencia de los inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto. La micrografías corresponden al control (a) y a la incubación con Fal 5,78 μM (b), Lat A 0,08 μM y Ble 0,72 mM (c, d). La barra de escala indica en todos los casos 10 μm .

5.3-CONFIRMACIÓN DE LA EXISTENCIA DE ACTINA Y MIOSINA EN LAS TELIOSPORAS

5.3.1- Detección por Western Blotting

Las bandas obtenidas por separación electroforética del lisado celular de las teliosporas fueron transferidas a una membrana de PVDF (*Western Blotting*). La presencia de actina contenida en el lisado fue revelada mediante la utilización de

anticuerpos específicos anti-actina de eucariotas. Debido a que se trataba de un primer ensayo electroforético realizado con el contenido de las teliosporas, también la fracción insoluble del lisado fue cargada en el gel para descartar que la actina se mantuviese unida a la fracción insoluble tras el lisado.

La Figura 78 muestra la presencia de una proteína de un peso aproximado de 50

kDa, detectada únicamente en la fracción soluble del lisado celular. La proteína revelada a los 50 kDa tenía un peso muy similar a la β -actina (actina no muscular) procedente de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster usada como control.

Figura 78

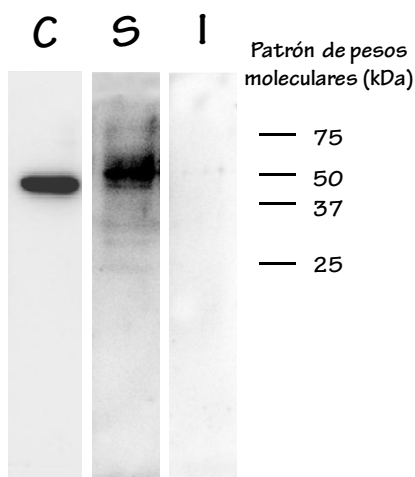


Figura 78. Western Blotting de las fracciones (soluble, S, e insoluble, I) resultantes del lisado de una muestra de teliosporas para el cual se utilizaron anticuerpos específicos anti-actina de eucariotas. El control (C) utilizado correspondía a actina de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster.

De igual manera, miosina contenida en la fracción soluble fue detectada por anticuerpos específicos tras su separación electroforética por PAGE-SDS (Figura 79). Tres anticuerpos diferentes fueron utilizados para detectar, respectivamente, las cadenas pesadas IIA y IIB y la cadena ligera de la miosina.

Figura 79

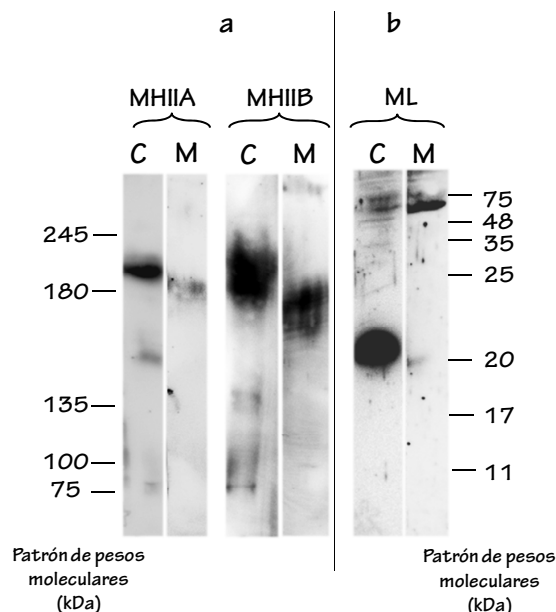


Figura 79. Western Blotting de la fracción soluble resultante del lisado de una muestra (M) de teliosporas en el que se utilizaron anticuerpos específicos contra las cadenas pesadas de la miosina (*myosin heavy chains*, MH) IIA y IIB. Los controles (C) utilizados correspondían a MHIIA y MHIIB de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster. b) Western Blotting de la fracción soluble resultante del lisado de una muestra (M) de teliosporas en el que se utilizaron anticuerpos específicos contra la cadena ligera de la miosina (*myosin light chain*, ML). El control (C) utilizado correspondía a ML de la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster.

Todos los anticuerpos reconocieron de manera específica las diferentes cadenas de la miosina en el lisado de teliosporas de *S. scitamineum*. Una proteína de 180 kDa fue reconocida por el anticuerpo dirigido contra la cadena pesada IIA de la miosina de eucariotas (MHIIA). La migración

electroforética de esta proteína fue muy semejante a la migración de la cadena MHIIA de la muestra control. Lo mismo fue observado durante el estudio de reconocimiento de la cadena pesada MHIIIB. Se detectó la presencia de una proteína en torno a los 170-180 kDa.

La muestra control reveló una banda mayoritaria de 20 kDa correspondiente a la cadena ligera de la miosina (ML), aunque también presentó marcaje en torno a los 70 kDa. En la muestra del lisado de teliosporas se detectó una proteína de migración semejante a esta última pero nada se detectó en torno a los 20 kDa.

5.3.2- Detección por microscopía óptica confocal: colocalización actina-miosina

Para la localización del citoesqueleto en las células de *S. scitamineum* mediante microscopía confocal se siguió el protocolo descrito en el apartado 12.4.1 (Localización de actina y miosina en las teliosporas de *S. scitamineum* en ausencia y en presencia de HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14). Se analizaron las variaciones en su distribución en presencia de inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto, con el fin de evidenciar si estos agentes producían modificaciones en la polaridad de la actina en las células del patógeno.

En primer lugar, se detectó marcaje fluorescente para la actina y la miosina en el interior de teliosporas no tratadas (Figuras 80 y 81). Muchas de las células control mostraron una distribución homogénea de la actina, la cual en todos los casos mostraba co-localización con la miosina. Durante la germinación en las células control, la actina y la miosina se distribuían por la hifa naciente, lo cual debe estar íntimamente relacionado con la necesidad de un transporte activo de macromoléculas durante la germinación y el desarrollo del patógeno (Deacon, 2006).

Tras la incubación en presencia de glicoproteínas HMMG procedentes de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 se observaron variaciones en el marcaje del citoesqueleto de actina y miosina. Muchas de las células mostraron entonces una distribución polarizada del citoesqueleto (Figuras 82, 83 y 84). De nuevo la actina y la miosina co-localizaron en la célula, indicando que deben participar conjuntamente en el establecimiento de la polaridad celular en las teliosporas de *S. scitamineum*.

Figura 80

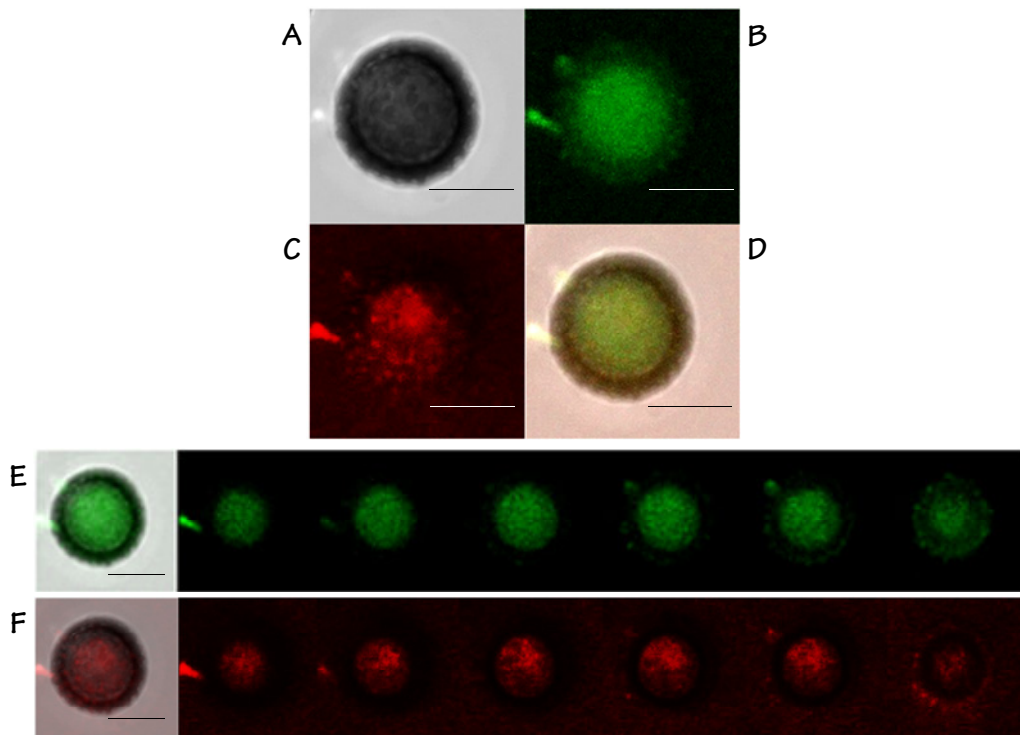


Figura 80. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondientes a una espora control, sin tratar con glicoproteínas HMMG o inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5μm.

Figura 81

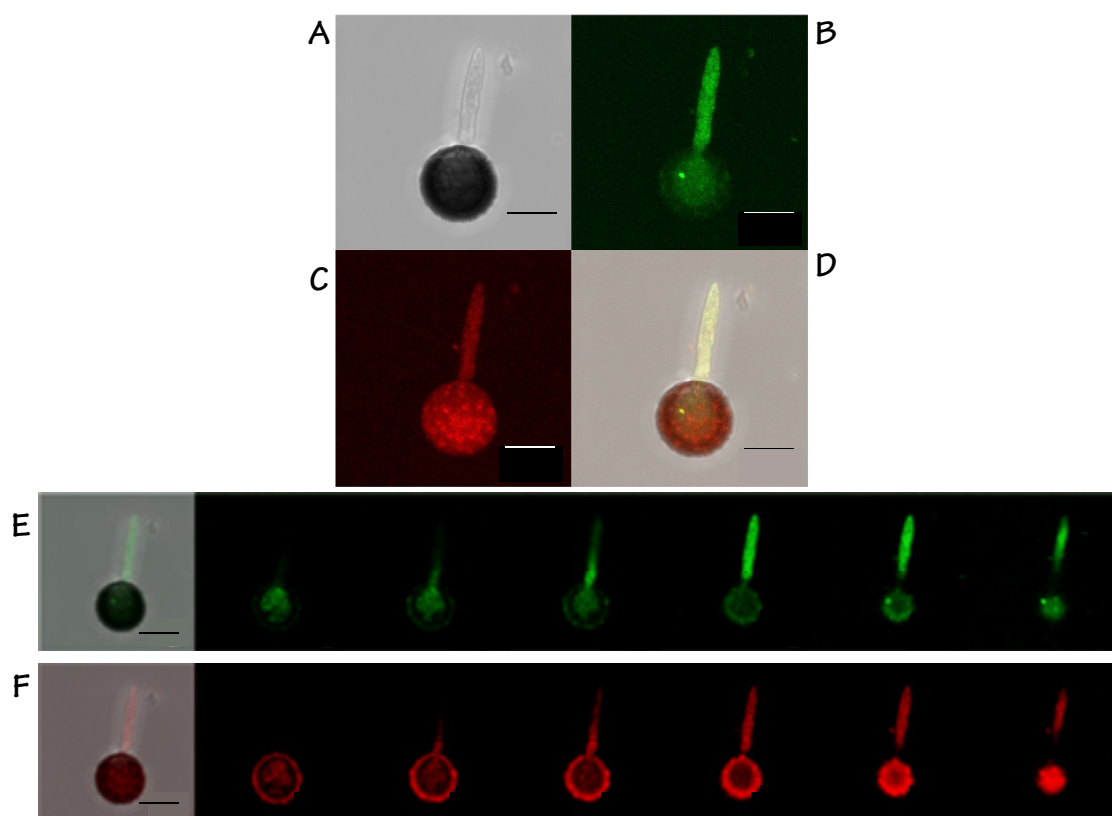


Figura 81. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondientes a una espora control, sin tratar con glicoproteínas HMMG o inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5μm.

Figura 82

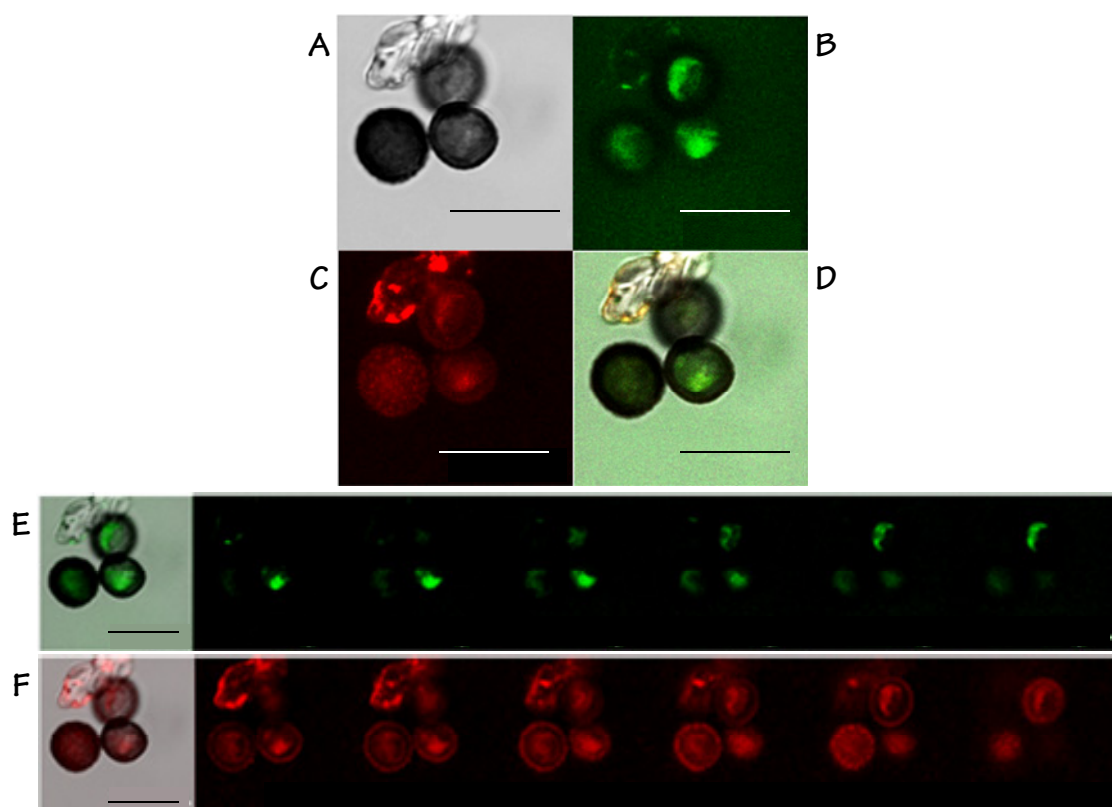


Figura 82. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de teliosporas tratadas con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 10 μm.

Figura 83

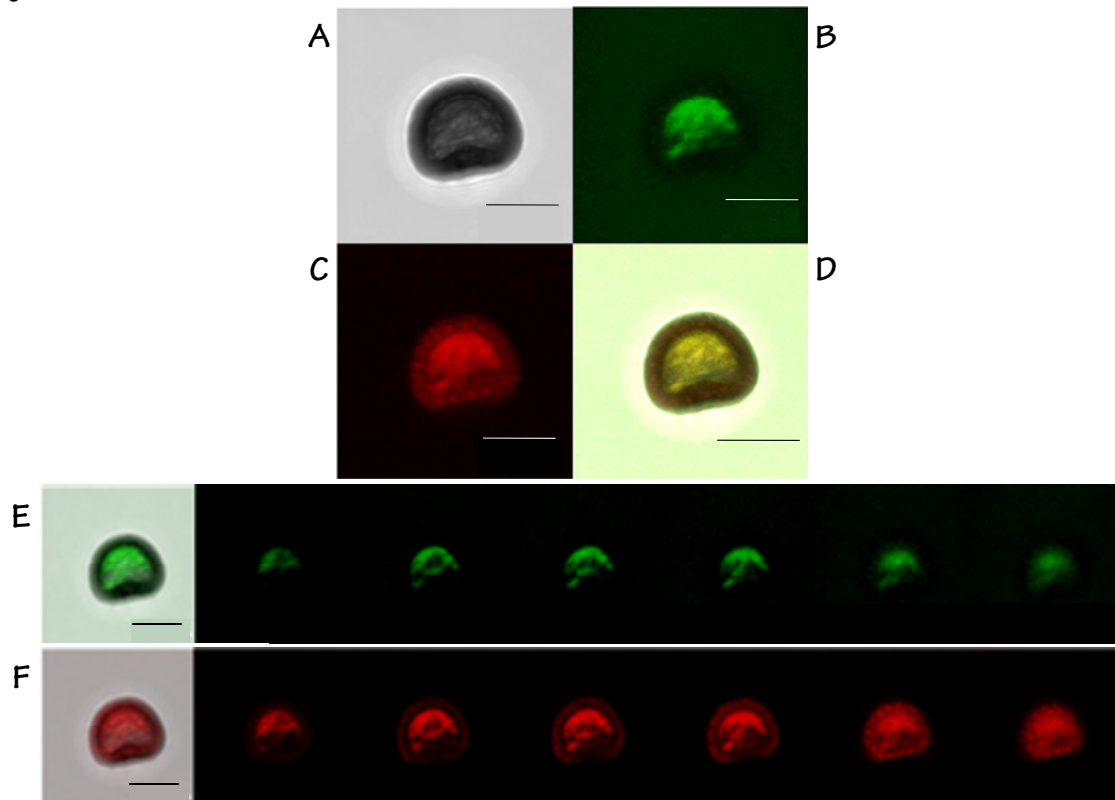


Figura 83. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondiente a una teliospora tratada con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5 μ m.

Figura 84

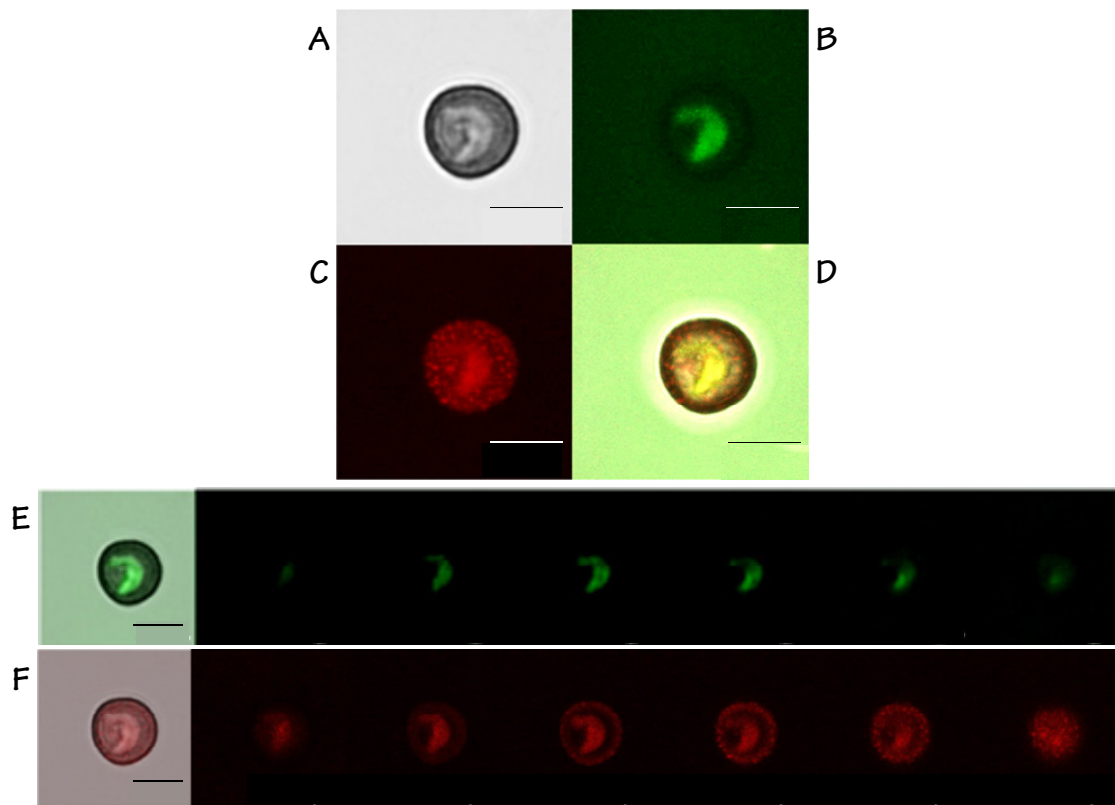


Figura 84. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal correspondiente a una teliospora tratada con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5 μ m.

La distribución de la actina y la miosina fue también observada en presencia de inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto (Ble, Fal, Lat A). Grandes alteraciones fueron detectadas tras la incubación con esta última, donde el marcaje de la F-actina fue difícil de identificar, debido probablemente a la ausencia de polimerización del citoesqueleto en

presencia del inhibidor (Figura 85), ya que la actina despolimerizada no podría ser reconocida por la Faloidina Alexa Fluor®-488. El marcaje de la miosina se presentaba más intenso que el de la actina con Lat A. Aún así, su distribución era homogénea, confirmando la ausencia de polaridad celular en presencia del inhibidor.

Figura 85

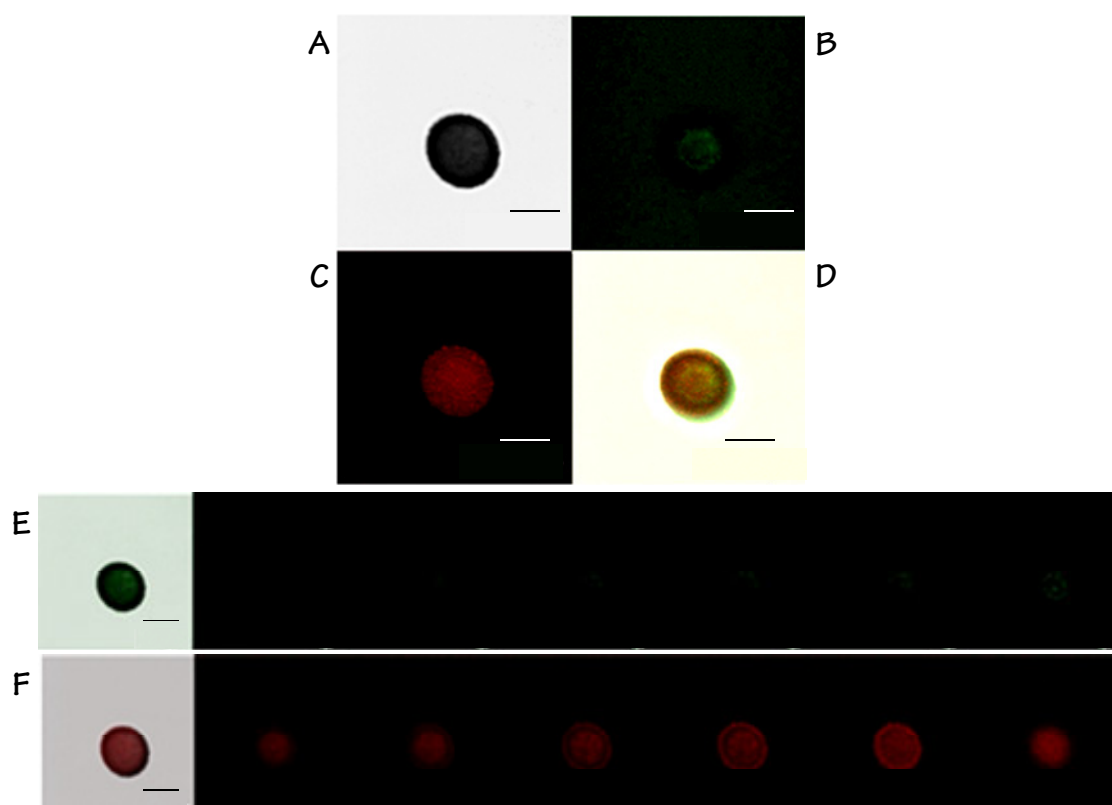


Figura 85. Serie de imágenes obtenida por microscopía confocal de una espora tratada con glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 y Lat A. Se muestra la proyección en el eje Z en campo claro (A), la proyección en el eje Z para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (B), la proyección en el eje Z para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (C) la resultante de la combinación de A, B y C (D), la serie completa para el marcaje con Faloidina Alexa Fluor®-488 (E) y la serie completa para el marcaje con anti-fosfo MLC-568 (F). La barras de escalas indican 5 μ m.

La distribución de la actina en las células fue valorada a partir de las micrografías obtenidas en función de los siguientes parámetros: i) número de células que presentaban una distribución asimétrica de la fluorescencia, ii) fluorescencia media de las células, iii) diferencias entre el valor mínimo y máximo de fluorescencia en las células, iv) fluorescencia total por célula (Figura 86).

Se puede observar, en primer lugar, que las glicoproteínas HMMG del cv. My 55-14 favorecieron la organización asimétrica del citoesqueleto en el interior celular en relación al control (Figura 86 a) a pesar de que la fluorescencia media por pixel, así como la fluorescencia total por célula, disminuyeron drásticamente en presencia de las glicoproteínas (Figura 86 b y d).

Figura 86

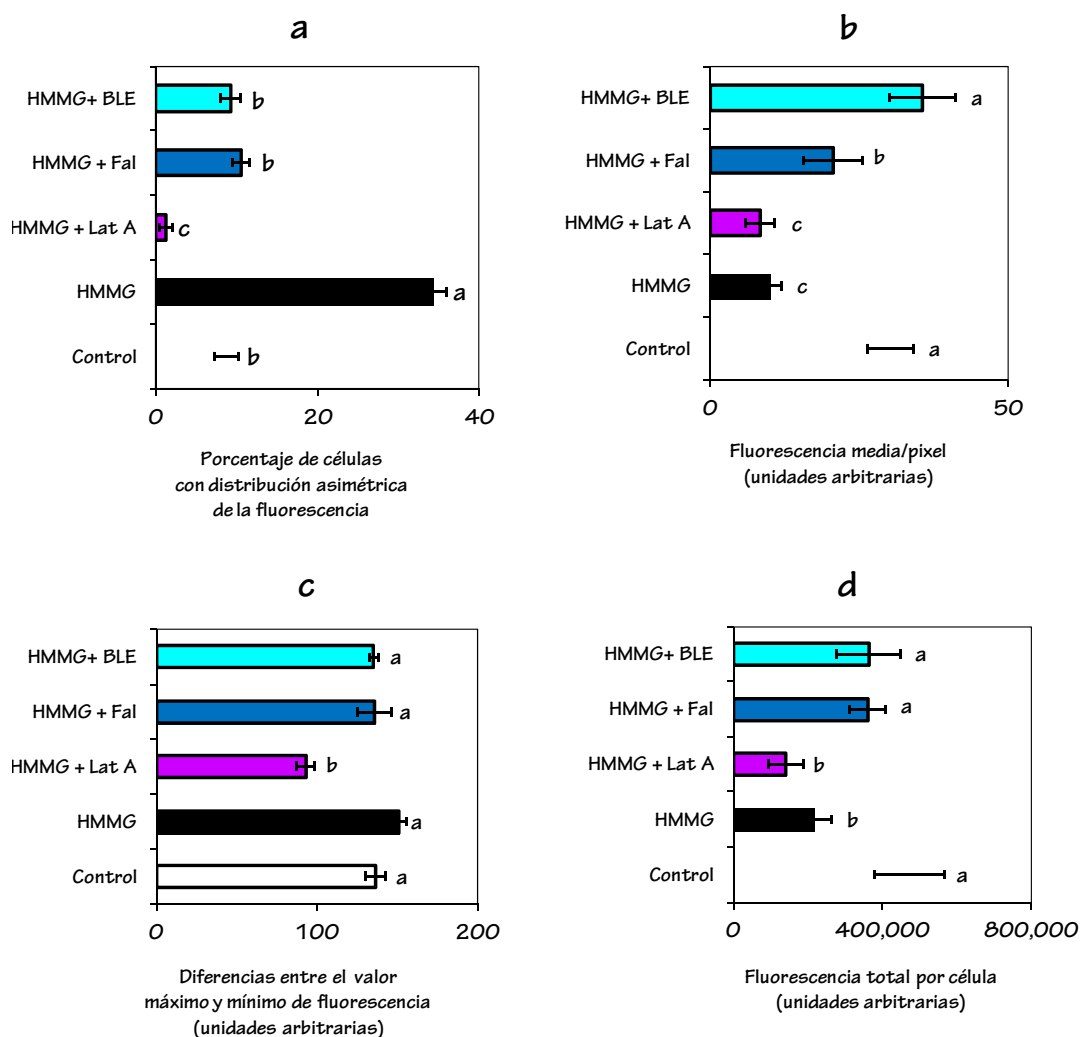


Figura 86. Análisis a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de la distribución de la actina fluorescente en teliosporas previamente estimuladas por HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 en ausencia o en presencia de los inhibidores Fal, Lat A y Ble. Un control fue realizado en ausencia de HMMG y cualquier inhibidor. Se muestra el porcentaje de células que presentaron distribución asimétrica de la fluorescencia (a), la intensidad media de la emisión de fluorescencia por pixel (b), el valor correspondiente a la diferencia entre la intensidad máxima y mínima de fluorescencia (c) y la intensidad total de emisión de fluorescencia por célula (d). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en agar 0,1% (p/v) tras 15 h de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Lat A redujo el porcentaje de células que presentaban una disposición asimétrica

de la actina en relación al control así como la fluorescencia media y total en las células

(Figura 86 a, b y d). Fal y Ble no modificaron el porcentaje de células polarizadas en relación al control, pero las células tratadas con Ble incrementaron la intensidad de su fluorescencia media en relación al resto de tratamientos (Figura 86 b), aunque estas diferencias no fueron significativas. La distribución simétrica o asimétrica de la F-actina es también reflejada en la Figura 86 c, donde las diferencias entre los valores máximo y mínimo de fluorescencia en el interior de las células se relacionan

directamente con el grado de polaridad que poseen. Estas diferencias incrementaron por adición de las glicoproteínas y disminuyeron por efecto de Lat A.

5.3.3- Detección por Microscopía Óptica Confocal: colocalización actina-núcleo

La Figura 87 muestra la localización nuclear y de la actina en células no tratadas en distintas fases de desarrollo.

Figura 87

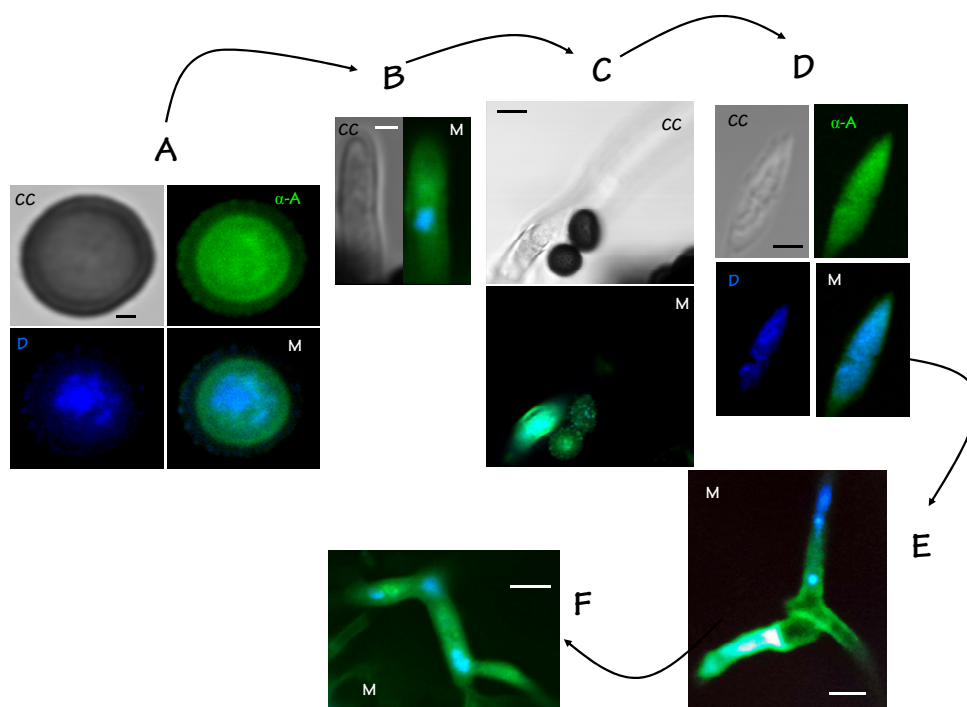


Figura 87. Proyección en el eje Z de series de 8-10 micrografías obtenidas por microscopía confocal que muestran la organización actínica y nuclear en distintos estadios durante la germinación de teliosporas de *S. scitamineum*. Se representa la organización previa a la germinación (A), migración del núcleo a lo largo de una hifa en crecimiento (B y C), esporidios haploides liberados (D), conjugación (E) y aparición de micelio infectivo (F). CC, campo claro; α-A, localización de la actina mediante la utilización de anticuerpos anti-IgG conjugados a Alexa Fluor-488, D; tinción nuclear con DAPI, M; merged o combinación. Las barras de escala indican 1,0 μm en A y B, 2 μm en D y 5 μm en C, E y F.

En la serie, en A, correspondiente a una teliospora antes de germinar, puede observarse una distribución homogénea de la actina por todo el citoplasma y un núcleo compacto en el interior celular. También puede visualizarse la actina cortical, próxima a la membrana plasmática. En B y C se presenta la migración nuclear a través de una hifa en crecimiento y en D, la organización de la actina en un esporidio liberado al medio. La conjugación de dos esporidios sexualmente compatibles (E) da lugar a la aparición de micelio dicariótico infectivo (F). En todas estas fases se observa una organización actínica en el citoplasma celular y en ocasiones en el interior del núcleo (C, E).

5.3.4 Localización de la actina fúngica mediante microscopía electrónica

Se recurrió de nuevo a la técnica de TEM, esta vez para la localización de la actina mediante anticuerpos específicos unidos a ferritina. La deposición de ésta en el interior celular señala la localización de los anticuerpos y, por tanto, indica la distribución de la proteína que éstos reconocen. Los resultados se muestran en la Figura 88.

En A, correspondiente a una célula control, no tratada, puede observarse la presencia de ferritina en todo el interior

celular. Sin embargo, es únicamente en la región cortical donde ésta se acumula y organiza de manera lineal, lo cual debe relacionarse con la presencia de filamentos de actina en la zona citoplasmática más externa. En las Figura 88 B y C, la estimulación de las células con HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 conduce a un incremento en la acumulación de ferritina en las células, las cuales muestran regiones más oscuras (resultado de la deposición del metal) por todo el citoplasma, y no sólo en su región más externa. La organización de la actina en filamentos parece ser necesaria para la creación de las invaginaciones características observadas durante la quimiotaxis en presencia de HMMG (B, C).

En presencia de Lat A (D, E) no se detectó una deposición organizada de ferritina, salvo en algunos puntos en la zona cortical (E). La droga afectó a la morfología general de las células. Muchas mostraron afectación de la integridad de su membrana y pared celular. Estas células, dañadas, no pudieron evitar la salida de los componentes citoplasmáticos al exterior (D). La destrucción celular generalizada fue detectada también por la presencia de cuerpos apoptóticos en las células que habían sido previamente incubada en presencia de Lat A (E).

Figura 88

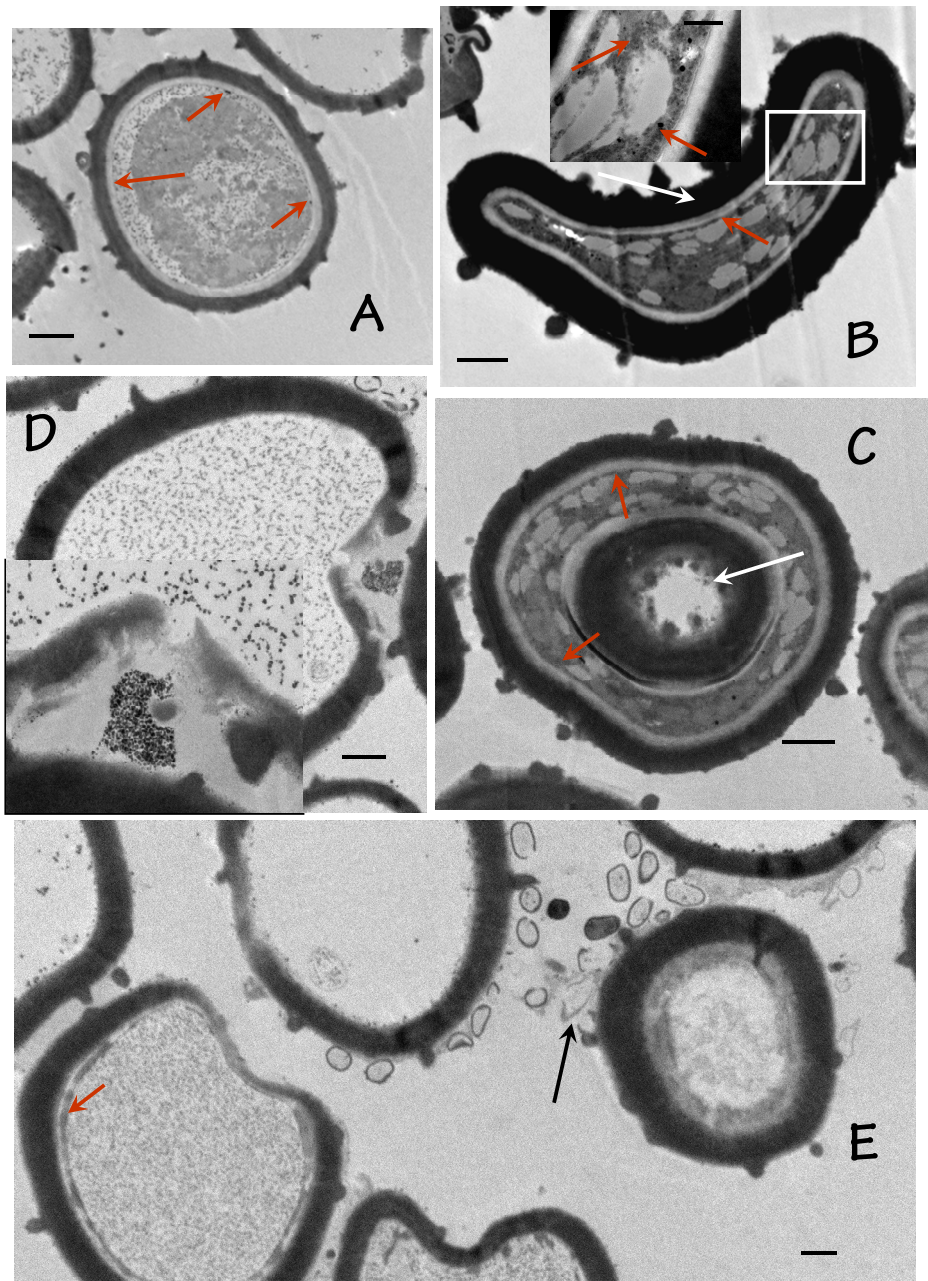


Figura 88. Micrografías obtenidas por TEM que muestran células no tratadas (A), estimuladas con HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (B, C) o incubadas en presencia de HMMG + Lat A 10 μ M (D, E). La detección de la actina celular se hizo en presencia de anticuerpos anti β -actina unidos a ferritina, para la visualización de la actina por deposición del metal. Las flechas rojas señalan regiones con ferritina depositada, las flechas blancas indican la presencia de invaginaciones y la flecha negra la localización de cuerpos apoptóticos. En B y D se representa la ampliación de una región de la micrografía correspondiente. Las barras de escala indican 0,7 μ m en las micrografías completas y 0,2 μ m en las ampliaciones mostradas.

5.4-EFECTO DE LAS HMMG DE PLANTAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS SOBRE LA ORGANIZACIÓN ACTÍNICA Y NUCLEAR DE LAS TELIOSPORAS

El efecto de las glicoproteínas sobre la organización actínica y nuclear de las teliosporas fue evaluado por microscopía confocal en células de *S. scitamineum* previamente tratadas con HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de ambos cvs., según se describe en el apartado 12.4.2 (*Localización actínica y nuclear en las teliosporas de S. scitamineum durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs*) de Material y Métodos. Paralelamente, algunas esporas fueron incubadas en presencia de jasplaquinolida (Jas), un agente polimerizante de la actina, con el fin de añadir un control positivo que revelara la disposición de la actina polimerizada. Algunas de las imágenes más relevantes obtenidas por microscopía confocal se muestran en la Figura 89.

Mientras que las células control revelaban una distribución homogénea de los filamentos de actina por el citoplasma, las células fúngicas, en presencia de Jas 5 y 10 μM , mostraban una organización asimétrica de la F-actina en el citoplasma. Los mayores efectos fueron observados para la concentración 10 μM de la droga, pudiéndose distinguir claramente las

regiones que contenían los filamentos polimerizados.

Muchas de las teliosporas que habían sido incubadas con las glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (Figura 89 A, B, C) mostraron una disposición polarizada de los filamentos, como ya había sido comprobado en experimentos anteriores (Figuras 82, 83 y 84). Muchas presentaban un característico marcaje externo, en forma de anillo, próximo a la zona cortical. En muchas ocasiones, el marcaje nuclear era difuso (resultados no mostrados), lo que se asoció con una posible descondensación nuclear causada por las glicoproteínas que dificultara la visualización del marcaje.

En presencia de HMMG de plantas inoculadas de My 55-14, el marcaje más externo desapareció (Figura 89 D, E F), los núcleos aparecieron descondensados y fragmentados y la actina parecía acumularse en la zona nuclear, tendiendo a desaparecer aquella distribuida citoplásmicamente. Los daños nucleares causados por las glicoproteínas serían posteriormente cuantificados (apartado 6.3.3 (*Efecto de las glicoproteínas sobre la condensación nuclear*) de Resultados).

Las glicoproteínas producidas por el cv. susceptible provocaron menores las alteraciones nucleares y de la actina (G, H). La distribución de esta última, citoplásmica

Figure 1 displays fluorescence microscopy images of *Drosophila* ommatidia, showing the expression of α -A and the localization of various markers (CC, D, M, ND) in response to Jas treatment.

The figure is organized into three columns: Control, Jas 5 μ M, and Jas 10 μ M. The rows show different views and markers:

- Top Row:** Whole ommatidia. Arrows indicate the central cell (CC) and the central cell (CC).
- Row A-C:** Individual ommatidia. Arrows indicate the central cell (CC) and the central cell (CC).
- Row D-H:** Individual ommatidia. Arrows indicate the central cell (CC) and the central cell (CC).

Labels: α -A, CC, D, M, ND.

179

6-EFECTO DE LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG SOBRE LA ORGANIZACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS (MT) DE LAS TELIOSPORAS

6.1-PRESENCIA TUBULINA EN LAS CÉLULAS FÚNGICA

6.1.1-Extracción de tubulina fúngica y separación por PAGE-SDS

Mediante el protocolo detallado en el apartado 3.5 (*Obtención de tubulina semi-purificada a partir del lisado celular de S. scitamineum*) de Material y Métodos, la tubulina fue aislada del total proteico contenido en las teliosporas. El resultado de la pre-purificación fue sometido a separación electroforética en presencia de SDS en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS). Tras la separación, el gel obtenido fue revelado mediante tinción de plata (Figura 90).

Ocho bandas claras, separadas en relación a su movilidad electroforética, pudieron ser visualizadas tras el revelado. El peso molecular asociado a cada banda, mostrado en la Figura 90, fue calculado a partir de la movilidad electroforética de cada proteína contenida en el patrón de pesos moleculares.

Una nueva separación electroforética de la tubulina semi-purificada fue realizada, sometiéndose en esta ocasión a

transferencia a membrana (*Western Blotting*) para identificar la presencia de tubulina mediante la utilización de anticuerpos específicos (Figura 91). La α y γ tubulina no fueron detectadas tras la separación (resultados no mostrados).

Figura 90

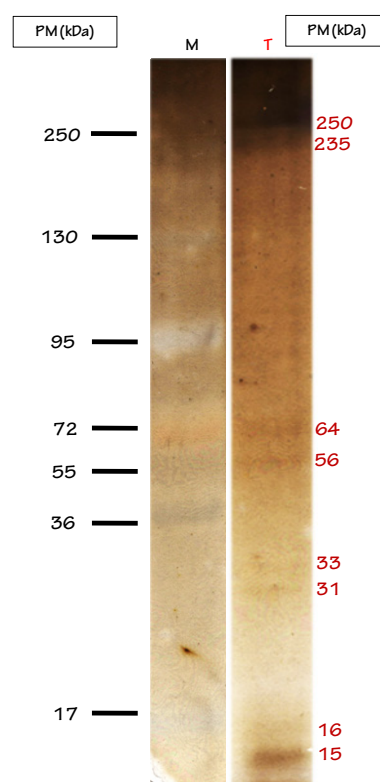


Figura 90. PAGE-SDS y tinción posterior con nitrato de plata de tubulina semi-purificada (T) de teliosporas de *S. scitamineum* según el protocolo descrito en 3.5 de Material y Métodos. M; marcador de pesos moleculares.

Sin embargo, una banda se reveló en torno a los 55 kDa, correspondiendo con la presencia de tubulina acetilada. La tinción previa con nitrato de plata (Figura 82) ya mostraba una banda de 56 kDa que pudo, con alta probabilidad, confirmarse como

tubulina monomérica tras su detección con anticuerpos específicos (Figura 91).

Figura 91

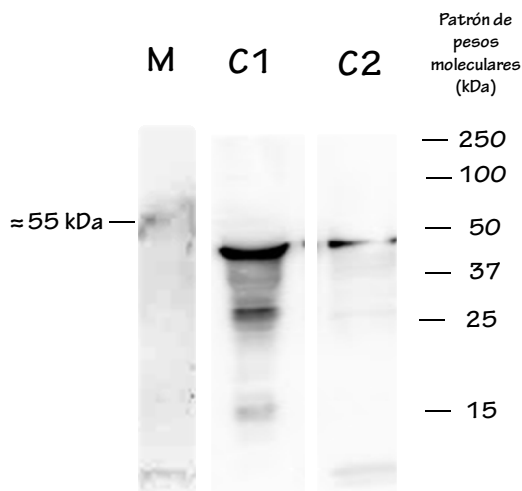


Figura 91. Western Blotting de tubulina semi-purificada (M, muestra), utilizando un anticuerpo específico contra la tubulina acetilada. Los controles (C) utilizados fueron tubulina correspondiente a la línea celular CHO.K1 de ovario de hámster (C1) y tubulina humana correspondiente a linfocitos T de la línea celular Jurkat (C2).

6.1.2-Interacción de la tubulina fúngica aislada con Nocodazol (Noc)

La tubulina semi-purificada, fue utilizada para valorar el efecto de Noc, un agente inhibidor de la organización de MT en células eucariotas (Zieve *et al.*, 1980), sobre la polimerización de la proteína *in vitro* (Figura 92), con el fin de discernir si existió o no interacción entre los monómeros de tubulina y el inhibidor. El protocolo seguido para la valoración se describe en el apartado

16.1 (Polimerización *in vitro* de MT en presencia de nocodazol (Noc)) de Material y Métodos.

Figura 92

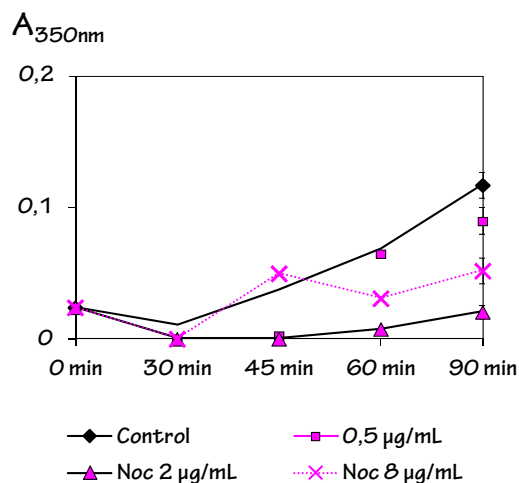


Figura 92. Valoración de la polimerización de tubulina semi-purificada como incremento de la absorbancia a 350 nm en tampón polimerizante en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes de Noc (0,5-8 $\mu g \cdot mL^{-1}$) a lo largo del tiempo (0-90 min). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

La absorbancia a 350 nm de la muestra control (incubada en ausencia de Noc) incrementó progresivamente con el tiempo de incubación, lo que indicaba un aumento en la polimerización de la tubulina contenida en la muestra. Sin embargo, la polimerización en presencia de Noc se vio alterada en presencia de las tres concentraciones de la droga ensayadas (0,5, 2 y 8 $\mu g \cdot mL^{-1}$), demostrándose que este agente es capaz de interaccionar con los monómeros de tubulina. Sin embargo, fue

en presencia de la concentración intermedia ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) donde se apreció el mayor efecto inhibitorio sobre su polimerización, al no observarse un incremento notable en la absorbancia a lo largo de los 90 min de experimentación.

6.1.3-Efecto del taxol sobre el inmunomarcaje de los MT en el interior celular

Se detectó por inmunofluorescencia la presencia de una organización microtubular en las células de *S. scitamineum* (Figura 93) siguiendo para ello el protocolo descrito en el apartado 12.4.4 (*Localización microtubular y nuclear en las teliosporas de S. scitamineum durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.*) de Material y Métodos.

Tras el marcaje, la mayoría de las células no tratadas mostraban una localización asimétrica de la fluorescencia, en forma de "media luna", tal y como muestra la teliospora de la Figura 93. Se ratificó que el marcaje observado correspondía a los MT por incubación de las células en taxol, un fuerte agente polimerizante de MT (Schiff *et al.*, 1979), ya que en presencia de éste, la inmunolocalización de la tubulina polimerizada debía sufrir notables modificaciones. Concretamente, el taxol produjo un incremento significativo de la fracción polimerizada de tubulina en las

células tratadas (Figura 93), las cuales mostraron unos agregados microtubulares cláramamente visibles.

Figura 93

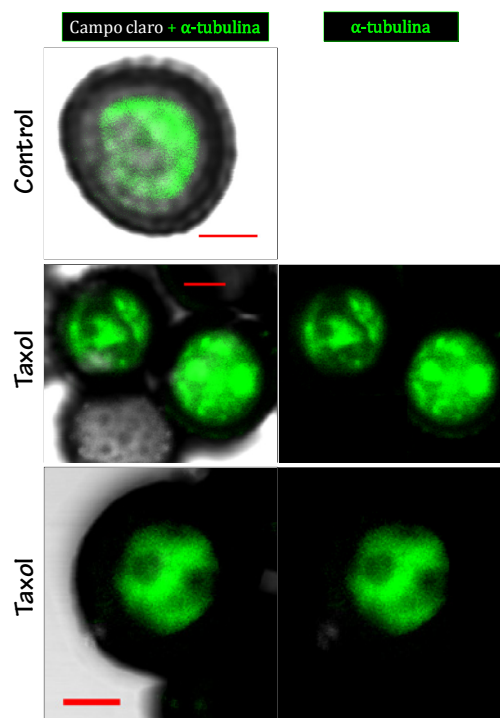


Figura 93. Micrografías obtenidas por microscopía confocal que muestran la organización microtubular en células control y tratadas con taxol $10 \mu\text{M}$. La fluorescencia verde indica la inmunolocalización de la tubulina en presencia (columna de la izquierda) o ausencia (derecha) de luz de campo claro. Las barras de escala indican en todos los casos $2 \mu\text{m}$.

En las células que no habían sido incubadas con la droga (control), los MT evidenciaban una polimerización dirigida (polarizada) hacia un único punto de la célula, probablemente el correspondiente al polo germinativo. Sin embargo, la polimerización microtubular en presencia de taxol no se

dirigía hacia ningún punto específico de la célula, sino que aparecía en forma de agregados por todo el citoplasma celular.

6.2-FUNCIÓN DE LOS MT EN LAS TELIOSPORAS DE *S. scitamineum*

6.2.1-Implicación de los MT en la germinación

Experimentos de germinación fueron realizados en presencia de nocodazol (Noc), con el fin de observar si el desarrollo de las

teliosporas se veía afectado por la disrupción de su organización microtubular. Los resultados se muestran en la Figura 94, donde puede comprobarse que Noc alteró el porcentaje de germinación de las teliosporas por medio de su efecto sobre la polimerización de los MT. La germinación total se redujo en un 50% en presencia de altas concentraciones del inhibidor ($8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) debido, concretamente, a un bloqueo en la liberación de esporidios (Figura 94).

Figura 94

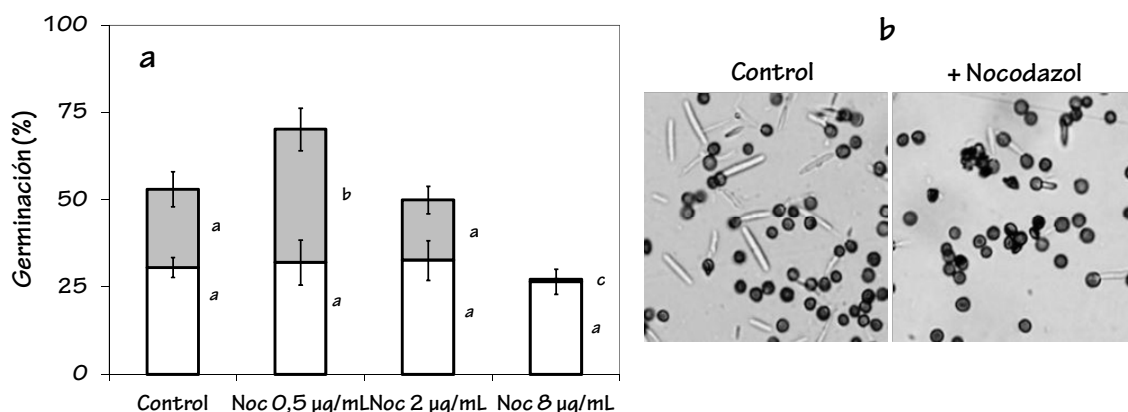


Figura 94. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes de Noc ($0,5$ - $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El efecto del inhibidor se valoró sobre el porcentaje de aparición de tubos germinativos (en blanco) y esporidios (en gris) en las muestras, incubadas sobre agar $0,1 \%$ durante 15 h . Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$), en cursiva para el porcentaje de tubos germinativos, en redonda para el porcentaje de esporidios liberados (a). Micrografías obtenidas mediante microscopio óptico que muestran el efecto inhibitorio del Noc ($8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre la germinación de las teliosporas, respecto a un control incubado en ausencia del inhibidor. Las barras de error indican $10 \mu\text{m}$ (b).

Así, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas sobre la aparición de tubos germinativos. Únicamente disminuyó significativamente su liberación al medio, en forma de esporidios, tras la incubación con altas concentraciones de Noc. Por otro lado, resultó interesante el hecho de que una baja concentración del inhibidor ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) estimulara la presencia de esporidios en el medio.

Finalmente, el efecto bloqueante del Noc sobre la liberación de los esporidios formados se hizo notable al poner en contacto las células con la droga durante prolongados tiempos de incubación (Figura 95). El porcentaje de germinación total (calculado a partir de la aparición tanto de tubos germinativos como de esporidios) disminuyó en presencia de Noc en más de un 50% en relación al control. Sin embargo, ningún esporidio fue liberado a lo largo de las 18 h de ensayo, aunque se hubieran formado tubos germinativos.

Fue interesante comparar simultáneamente los resultados obtenidos para Noc con el efecto de Lat A $5 \mu\text{M}$ sobre la aparición de tubos y esporidios (Figura 95), con el fin de establecer funciones diferenciadas para la actina y los MT durante la germinación. Mientras que Noc inhibió la liberación de esporidios aun habiéndose formado los tubos germinativos,

Lat A evitó incluso la aparición de estos últimos.

Figura 95

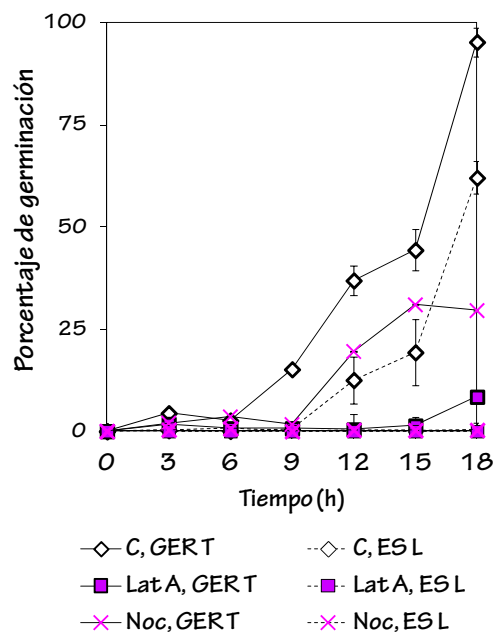


Figura 95. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de Noc y Lat A en agar 0,1% (p/v) a lo largo de 18 h de incubación. Se muestra el porcentaje de germinación total (GER T), referente a la aparición de tubos germinativos + esporidios, así como el porcentaje de esporidios liberados al medio (ES L), en ausencia (C, control) o en presencia de los inhibidores (Noc, Lat A). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

6.2.2-Implicación de los MT en la quimioatracción

Con la intención de comprobar si los MT también participan en la motilidad de las células de *S. scitamineum*, se analizó el efecto de concentraciones crecientes de

Noc sobre la cantidad de esporas que migran hacia un capilar conteniendo HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 como agente quimioattractante. En todos los casos se observó una disminución en el número de células desplazadas hacia el capilar en relación al control. (Figura 96). El máximo efecto se encontró a una concentración de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Noc, ya que a $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ parecía comenzar a revertirse el efecto inhibitorio.

Figura 96

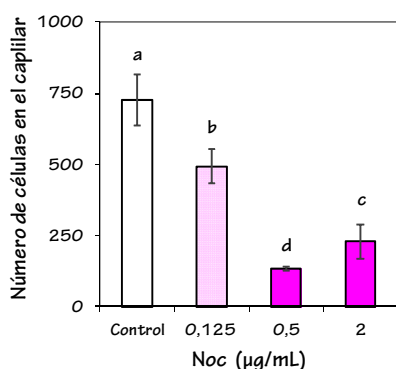


Figura 96. Número de teliosporas desplazadas hacia la fuente quimioattractante siendo ésta HMMG del cv. My 55-14. Donde se indica, concentraciones crecientes de Noc ($0,125$ - $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) fueron añadidas al medio de incubación. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

6.2.3-Implicación de los MT en el proceso de aglutinación

La citoaglutinación de las teliosporas fue valorada en presencia de Noc, siguiendo el

protocolo descrito en el apartado 11 (*Ensayos de citoaglutinación*) de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 97.

Figura 97

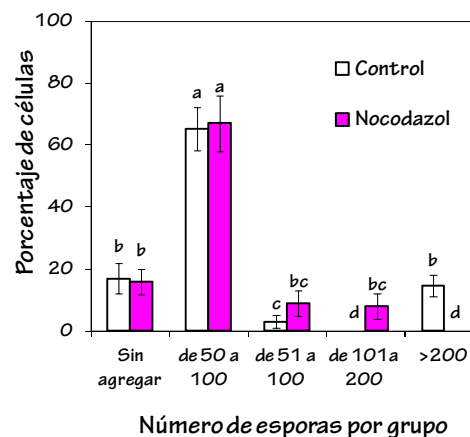


Figura 97. Variaciones en la aglutinación de las esporas en presencia de Noc. Los resultados se expresan como porcentaje de células implicadas en cada una de las distintas agrupaciones (teliosporas no agregadas, agregadas en grupos de 2 a 50 células, en grupos de 51 a 100 células, en grupos de 101 a 200 células o en grupos de más de 200 células). Las barras verticales representan el valor estándar asociado a cada medida y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

En presencia del inhibidor existió una disminución en la formación de grupos grandes de teliosporas en relación al control. Se observó un mayor número de células implicadas en la formación de grupos medianos (de 51 a 200 esporas), acompañado de la ausencia de las agrupaciones grandes (de más de 200

esporas) que habían sido visualizadas tras el ensayo realizado con células no tratadas.

6.2.4-Implicación de los MT en la polimerización de la actina

Sabiendo que tanto el citoesqueleto de actina como los MT están implicados en procesos tan importantes como la germinación o el quimiotropismo de las teliosporas, se pretendió conocer si existía interacción entre ambos componentes citoesqueléticos. Para ello, se cuantificó el porcentaje de células que presentaban una asimetría en la localización de la actina fluorescente en ausencia o en presencia de Noc (Figura 98 y 99), sabiendo que el inhibidor afecta directamente a la organización microtubular.

Figura 98

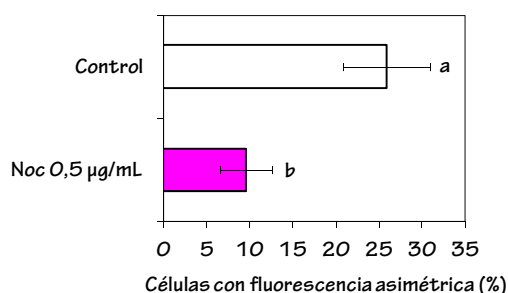


Figura 98. Porcentaje de células que presentaban asimetría en la organización de la F-actina en su citoplasma en ausencia (control) o en presencia de Noc 0,5 µg·mL⁻¹. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Figura 99

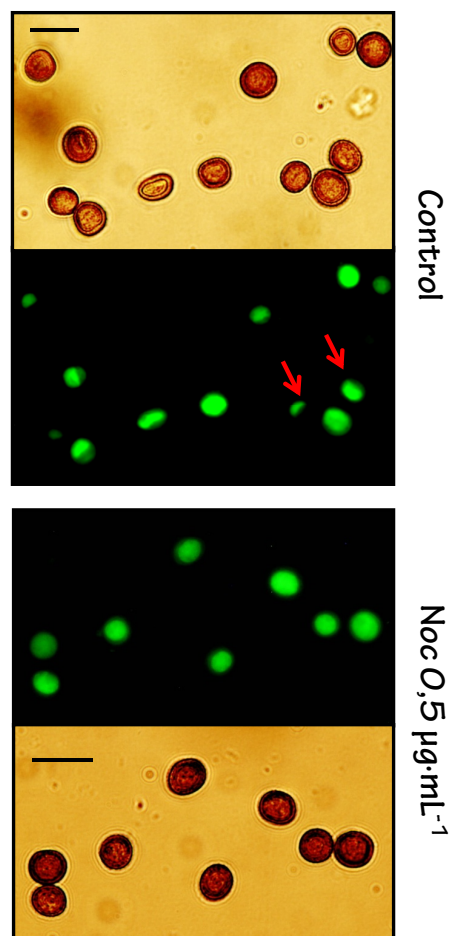


Figura 99. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia que muestran la distribución de los filamentos de actina, marcados con Fal-FITC, en células control o tratadas con Noc 0,5 µg·mL⁻¹. En cada caso, se muestra la imagen en campo claro y su correspondiente en fluorescencia. Las flechas rojas señalan las células polarizadas.

Se observó una disminución aproximada del 40% en el número de células que presentaban una disposición asimétrica de la F-actina en el interior celular en presencia de Noc 0,5 µg·mL⁻¹, lo que indicaba la existencia de una interacción entre los microfilamentos y los MT durante el

establecimiento de la polaridad celular en las teliosporas de *S. scitamineum*.

6.3-EFECTO DE LAS HMMG PROCEDENTES DE PLANTAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS SOBRE LA ORGANIZACIÓN MICROTUBULAR Y NUCLEAR DE LAS TELIOSPORAS

6.3.2- Efectos de las glicoproteínas HMMG sobre la migración nuclear: marcaje *in vivo*

Se analizó el efecto de las glicoproteínas HMMG de plantas control de My 55-14 sobre la migración nuclear durante la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum*, según describe el apartado 12.4.3 (Marcaje nuclear *in vivo* de células tratadas con HMMG) de Material y Métodos. Importantes alteraciones fueron encontradas cuando las células fueron incubadas en presencia de las glicoproteínas (Figura 100 b), en comparación con lo observado en las células control (Figura 100 a). Muchos tubos germinativos y esporidios, a pesar de haberse formado, aparecieron desprovistos de material nuclear en su interior (Figura 100 b) en las muestras tratadas, sugiriendo un fallo en la migración nuclear hacia el tubo germinativo formado.

Figura 100

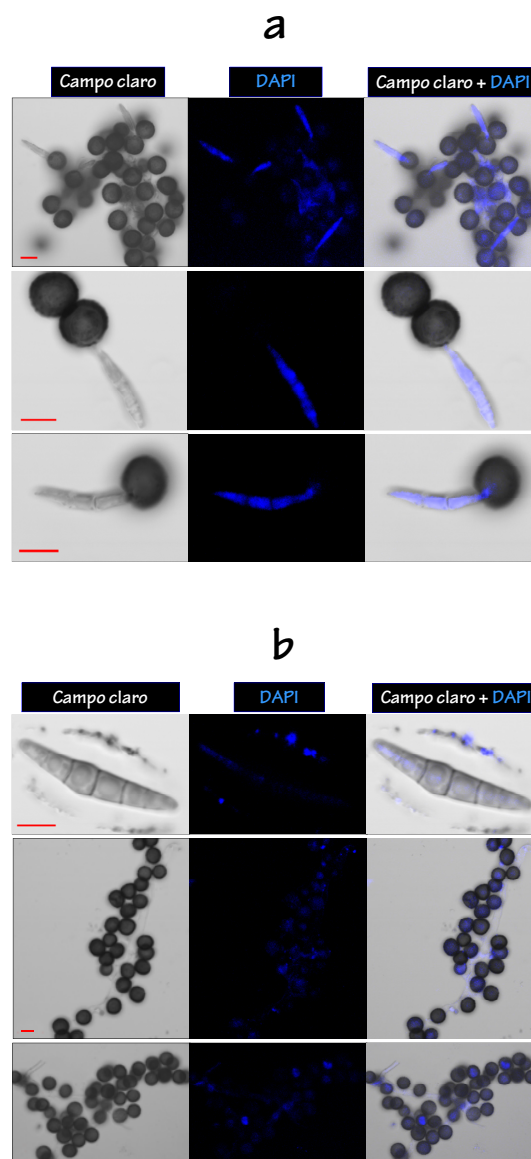


Figura 100. Micrografías obtenidas por microscopía confocal que muestran el efecto de las glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14 sobre la migración nuclear de teliosporas de *S. scitamineum*. Se muestra la localización nuclear en células control (a) o tratadas (b) tras 9 h de incubación. Para a y b se muestran imágenes en campo claro junto a su correspondiente con fluorescencia DAPI, así como la imagen resultante al combinar ambas luces. Barra de escala, 5 μm. EAN, esporidio anucleado.

Sospechando una relación directa entre la frustrada migración nuclear y la falta de organización microtubular, se llevaron a cabo experimentos de inmunolocalización de tubulina polimerizada en las células de *S. scitamineum* tras el contacto con las glicoproteínas de defensa de la caña de azúcar.

6.3.2- Efectos de las glicoproteínas HMMG sobre la polimerización de los MT

Se analizó el efecto de las glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas de ambos cvs. sobre la polarización de los MT de teliosporas de *S. scitamineum*, según describe el apartado 12.4.4 (*Localización microtubular y nuclear en las teliosporas de S. scitamineum durante la germinación en ausencia y en presencia de HMMG de ambos cvs.*).

La Figura 101 muestra la localización microtubular de un grupo de células que habían sido incubadas en agua, en ausencia de glicoproteínas HMMG. La mayoría de las teliosporas visualizadas en este tratamiento presentaban una distribución asimétrica de la fluorescencia. La polimerización de la tubulina en las teliosporas control se encontraba polarizada, es decir, dirigida hacia un punto específico en el interior celular.

Figura 101

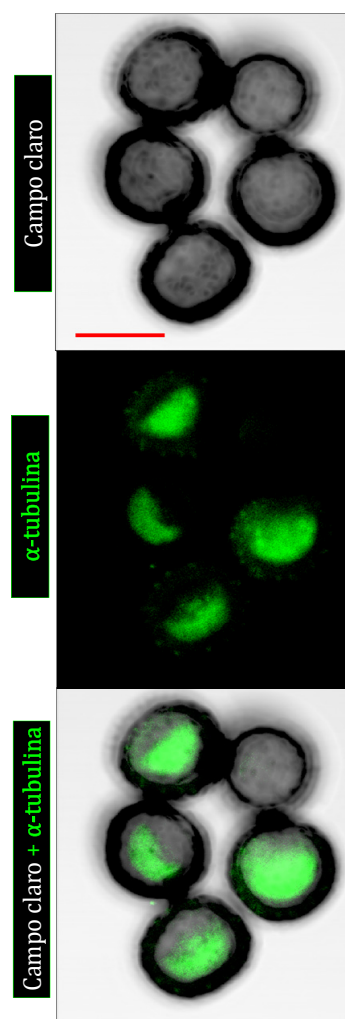


Figura 101. Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células control, que no habían sido incubadas en presencia de HMMG. Se muestra una imagen en campo claro, su correspondiente con fluorescencia y la combinación de ambas. La barra de escala indica 5µm. CP, célula polarizada.

Sin embargo, las esporas que habían sido previamente incubadas en presencia de glicoproteínas HMMG (Figura 102) mostraron grandes diferencias en la localización de la tubulina polimerizada en

relación a las células control, sobre todo aquellas que habían estado en contacto con glicoproteínas producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14. Éstas, en su mayoría, mostraron una distribución homogénea de la fluorescencia por todo el interior celular.

Figura 102

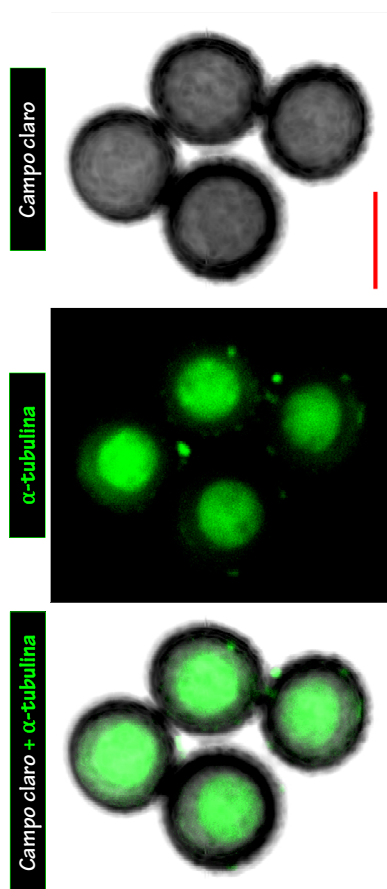


Figura 102. Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células tratadas con HMMG de plantas control del cv. My 55-14. Se muestra una imagen en campo claro, su correspondiente con fluorescencia y la combinación de ambas. La barra de escala indica 5µm. CNP, célula no polarizada.

El número de células que poseían o no una localización polarizada de los MT fue contabilizado en cada uno de los tratamientos. Los resultados se muestran en la Figura 103.

Figura 103

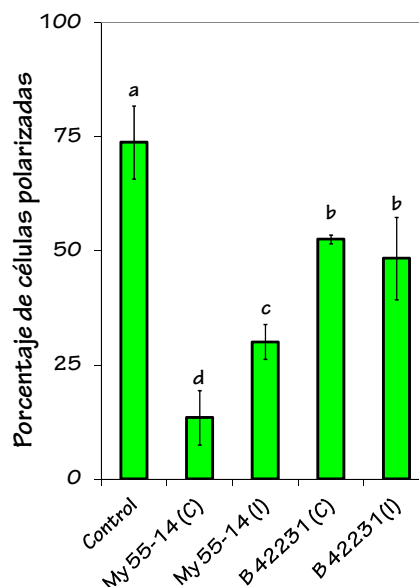


Figura 103. Porcentaje de células que presentaban una distribución polarizada de los MT en ausencia (control) o en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) de los cvs. My 55-14 y B 42232. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

Las imágenes de inmunolocalización de la tubulina marcada revelaron una disminución de, aproximadamente, un 70% en el porcentaje de células que presentaban una distribución polarizada de la fluorescencia cuando éstas habían sido tratadas con HMMG de plantas no

inoculadas del cv. My 55-14. Esta disminución fue un poco menor, ($\approx 40\%$) tras la incubación con HMMG de plantas inoculadas del mismo cv. Finalmente, las glicoproteínas producidas por el cv. susceptible originaron menores variaciones ($\approx 20\%$) en la polarización de la tubulina en relación a las células control.

6.3.3- Efecto de las glicoproteínas HMMG sobre la condensación nuclear

Las imágenes registradas por microscopía confocal en relación al marcaje con DAPI de los núcleos de las células de *S. scitamineum* permitieron evaluar las alteraciones nucleares producidas por los distintos tipos de glicoproteínas HMMG. Mientras que los núcleos de las células no tratadas se presentaban pequeños, nítidos y condensados (Figura 104 a), el material nuclear en las teliosporas incubadas en presencia de glicoproteínas HMMG se visualizaba desorganizado, descondensado y fragmentado (Figura 104 b).

Con el fin de hacer cuantificables las observaciones, se valoró el porcentaje de ocupación del núcleo sobre el total de área celular para cada uno de los tratamientos, con el fin de valorar si las glicoproteínas ejercían realmente algún efecto destacable sobre el nivel de condensación nuclear de las teliosporas del patógeno (Figura 105). Se observaron diferencias significativas en el

tamaño nuclear tras la incubación de las células en presencia de glicoproteínas de ambos cvs. Sin embargo, las mayores diferencias se encontraron de nuevo tras el contacto con las glicoproteínas del cv. resistente, las cuales aumentaron la descondensación nuclear de las teliosporas tratadas (Figura 105).

Figura 104

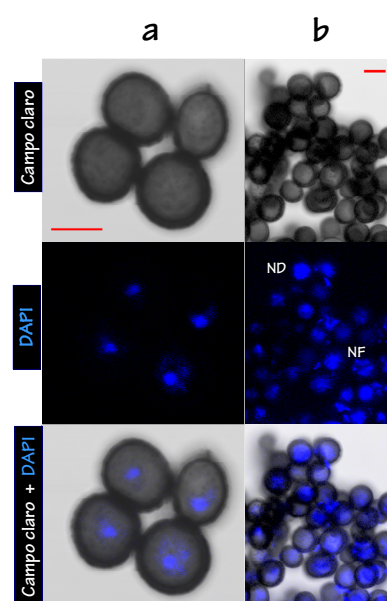


Figura 104. Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células control, que habían sido incubadas en ausencia de HMMG (a). Proyección en el eje Z de una serie de 8-10 micrografías obtenida por microscopía confocal correspondiente a un grupo de células tratadas con HMMG de plantas control del cv. My 55-14 (b). En (a) y (b) se muestra la imagen en campo claro, su correspondiente con fluorescencia-DAPI y la combinación de ambas. La barra de escala indica $5\mu\text{m}$. NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado; NF, núcleo fragmentado.

Figura 105

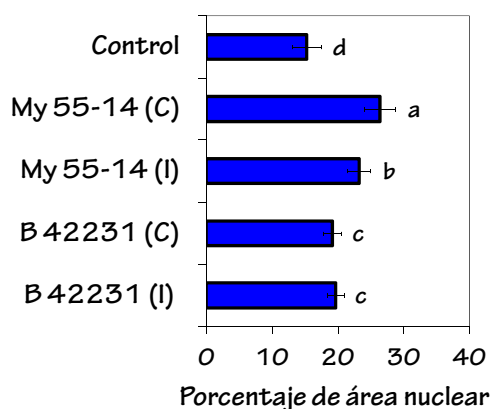


Figura 105. Porcentaje de ocupación nuclear dentro del total de área celular (área nuclear/área total) en teliosporas no tratadas (control) o tratadas con HMMG de plantas control (C) o inoculadas (I) de los cv. My 55-14 y B 4223. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

Además, más del 50% de estas células mostraron su núcleo total o parcialmente fragmentado tras el contacto con las glicoproteínas (Figura 106), mientras que únicamente el 20% de las esporas no tratadas poseían una fragmentación (parcial) de su contenido nuclear.

Las Figuras 107 y 108 muestran imágenes combinadas para la visualización del marcaje microtubular y nuclear en células que habían sido previamente tratadas con glicoproteínas HMMG de plantas producidas por el cv. resistente.

Figura 106

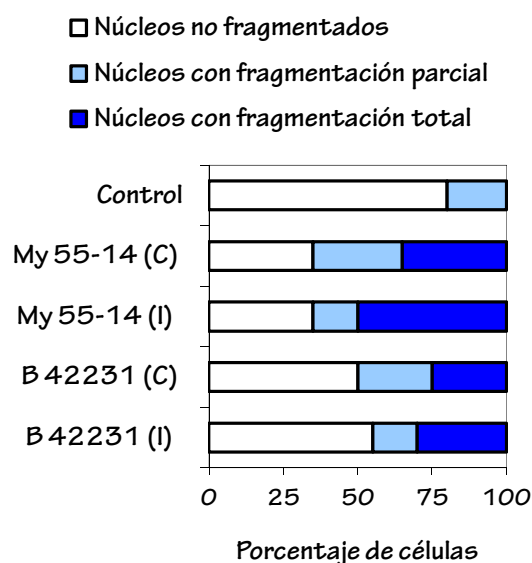


Figura 106. Porcentaje de células no tratadas (control) o tratadas con glicoproteínas HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) de los cv. My 55-14 y B 42231 que contenían el núcleo condensado o fragmentado (parcial o totalmente) tras cada uno de los tratamientos.

La Figura 107 muestra las alteraciones observadas en las células que habían sido incubadas en presencia de glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (c y d) en relación a las teliosporas no tratadas (a y b). Éstas últimas presentaban núcleos condensados y los MT en el interior celular se disponían mayoritariamente de manera polarizada (107 a). En los tubos germinativos emergentes se visualizaba la migración nuclear a través del poro germinativo y la aparición en las hifas de dos puntos de máxima polaridad (PMP) microtubular, uno en la base y otro de el

extremo apical de la hifa emergente (b). Sin embargo, la falta de polaridad microtubular así como la descondensación y fragmentación nuclear fueron alteraciones

apreciables en las células tratadas (c). Además, las hifas emergentes parecían desprovistas de material nuclear y de organización microtubular (d).

Figura 107

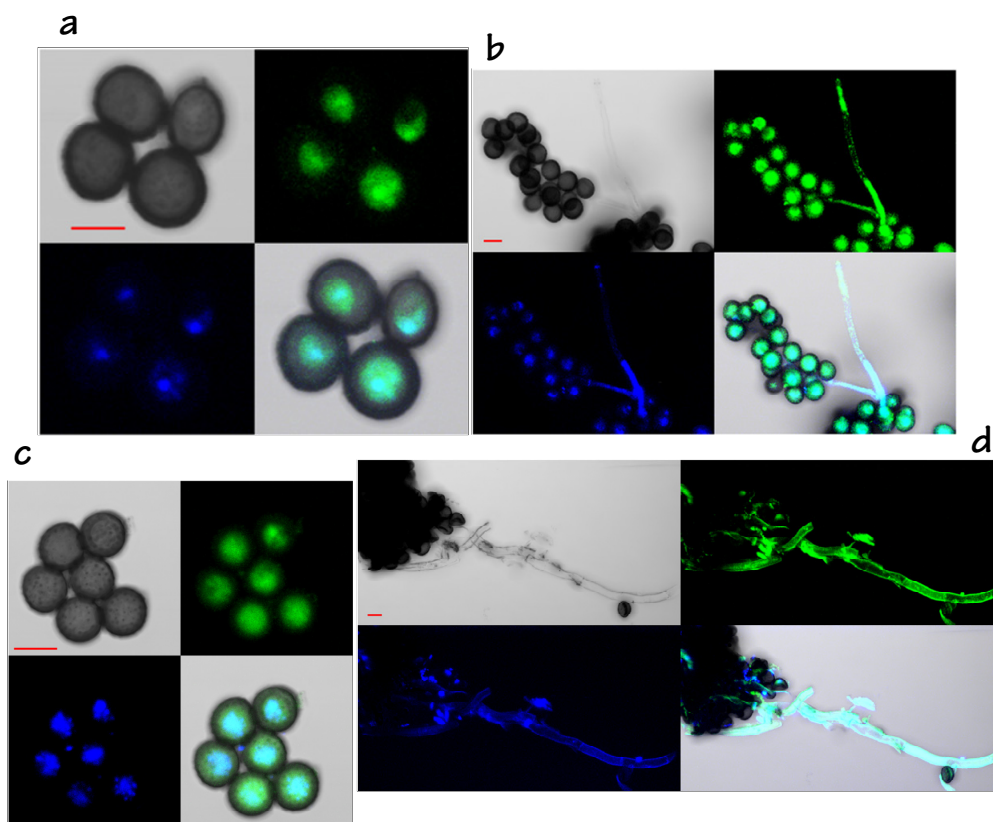


Figura 107. Proyección en el eje Z de series de 8-10 micrografías obtenidas por microscopía confocal correspondientes a células control (a, b) y células tratadas con HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (c, d). En a, b, c y d se muestran las imágenes obtenidas por campo claro y fluorescencia, para el marcaje nuclear y la localización de la tubulina. Se muestra también la imagen resultante de la combinación de todas ellas (merged). Las barras de escala indican 5µm. CP, célula polarizada; CNP, célula no polarizada; PMP, punto de máxima polaridad; NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado; NF, núcleo fragmentado.

En la Figura 108 se observa de nuevo la disposición polarizada de los MT en una

espora control, que presenta además un núcleo condensado. Sin embargo, las

teliosporas de las muestras tratadas presentan una organización microtubular no polarizada y sus núcleos aparecen descondensados y fragmentados, ocupando gran parte de la dimensión total celular. En la misma figura puede observarse un intento fallido de germinación en una de las células

donde, a pesar de haber comenzado a emerger el tubo germinativo, el material nuclear no es capaz de migrar correctamente debido al notable nivel de descondensación y fragmentación que presenta.

Figura 108

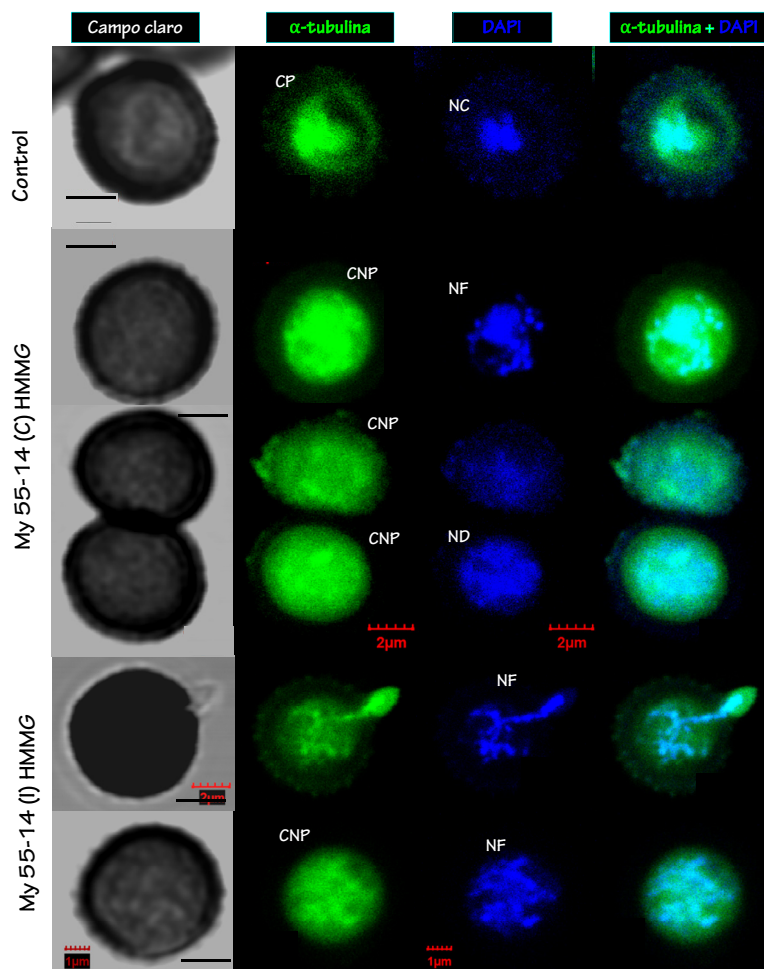


Figura 108. Micrografías obtenidas por microscopía confocal de células control y células tratadas con HMMG de plantas inoculadas (I) y no inoculadas (C) del cv. My 55-14. En cada caso, se muestran las imágenes obtenidas por campo claro y fluorescencia para el marcaje nuclear (DAPI) y la localización de la α -tubulina. Se muestra también la combinación de ambas imágenes fluorescentes (α -tubulina + DAPI). Las barras de escala indican 2 μ m. CP, célula polarizada; CNP, célula no polarizada; NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado; NF, núcleo fragmentado.

7-ALTERACIONES CELULARES PROVOCADAS POR LAS GLICOPROTEÍNAS HMMG POR MEDIO DE LA PRODUCCIÓN DE PAs

Si existe un efecto inhibitorio del desarrollo de *S. scitamineum* cuando éste crece en presencia de HMMG y si esta fracción glicoproteica tiene actividad arginasa, es lógico pensar que algún producto derivado de dicha actividad pudiera ser el responsable de esta inhibición.

En presencia de arginasa, la arginina puede transformarse en PUT y ésta en SPD y SPM, sucesivamente. Se planteó entonces que las PAs, producto de la actividad arginasa, podrían inhibir el desarrollo de las células de *S. scitamineum*.

7.1-LAS PAs SOBRE EL DESARROLLO DEL PATÓGENO

7.1.1-Efecto de las PAs sobre las germinación de las teliosporas

En primer lugar, el porcentaje de germinación de las teliosporas fue cuantificado en agar 0,1% (p/v) en presencia de concentraciones crecientes de PUT (Figura 109).

La diamina ejerció un efecto inhibitorio sobre la germinación. En general se observó una disminución en la cantidad de esporidios liberados al medio, como ya había

ocurrido en el caso de teliosporas incubadas en Noc (Figura 94). El máximo para la inhibición de la germinación (un 70%), fue alcanzado a la concentración de 7,5 mM, donde ya se vio afectada también la aparición de tubos germinativos. Resultó interesante que la concentración 0,1 mM de PUT favoreció la germinación del patógeno, de nuevo por medio de una mayor liberación de esporidios, como en el caso del Noc.

Figura 109

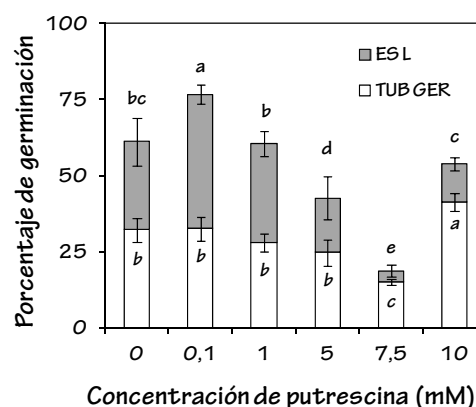


Figura 109. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes de PUT (0,1-10 mM). El efecto de la diamina se valoró sobre el porcentaje de aparición de tubos germinativos (en blanco) y esporidios (en gris) en las muestras, incubadas sobre agar 0,1 % durante 15 h. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$), en cursiva para el porcentaje de tubos germinativos, en redonda para el porcentaje de esporidios liberados.

La talla media de los tubos germinativos y los esporidios también fue cuantificada tras el mismo ensayo (Figura 110). De manera general, puede observarse una disminución del tamaño de ambas estructuras al incrementar en el medio la concentración de PUT. Solo en presencia de la diamina a una concentración de 0,1 mM el tamaño de los tubos germinativos incrementó en un 23% con respecto al control, lo cual debía estar necesariamente relacionado con el incremento en la cantidad de esporidios liberados que había sido observada paralelamente en presencia de PUT 0,1 mM (Figura 110).

En la Figura 111 se muestran los efectos que diferentes concentraciones crecientes de PUT y SPD (0,1-10 mM) ocasionaron sobre la germinación total, cuando ésta fue valorada en cámara de Neubauer para tiempos largos de incubación, según detalla el apartado 10.3 (*Ensayos de germinación en tubos Eppendorf y visualización en cámaras de Neubauer*) de Material y Métodos. Se observó un efecto negativo sobre la germinación en presencia de PUT a cualquiera de las concentraciones ensayadas si bien, este efecto era mayor cuanto mayor era la cantidad de diamina añadida al medio, siendo máxima la inhibición de la germinación en presencia de PUT 10 mM (Figura 111a y e).

Figura 110

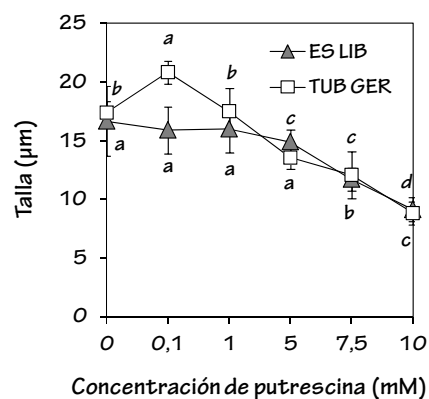


Figura 110. Talla media de los tubos germinativos emergidos (TUB GER) y de los esporidios liberados (ES L) durante el ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes de PUT (0,1-10 mM). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), en cursiva para la talla de los tubos germinativos, en redonda para la talla de los esporidios liberados.

A tiempos largos de incubación y a bajas concentraciones de SPD en el medio (0,1 mM), la germinación de las teliosporas se veía incrementada respecto al control, incubado en ausencia de la PA (Figura 111 b y d). La concentración extrema de 10 mM produjo una evidente inhibición de la germinación, mientras la incubación de las células fúngicas en presencia de concentraciones intermedias de SPD no derivó en diferencias significativas con el control.

Figura 111

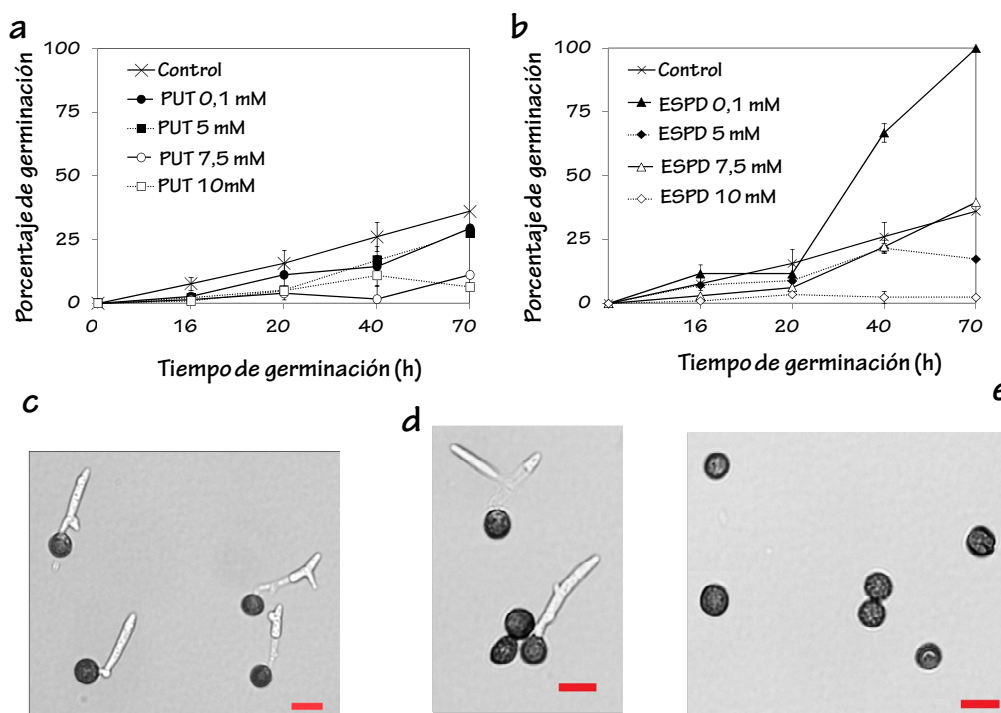


Figura 111. Ensayo de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en presencia de concentraciones crecientes (0,1-10 mM) de PUT (a) o SPD (b). El porcentaje de germinación para cada tratamiento fue valorado en cámara de Neubauer tras tiempos largos de incubación, entre 0 y 70 h. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Micrografías obtenidas por microscopía óptica correspondientes a muestras de teliosporas no tratadas (b), tratadas con SPD 0,1 mM (c) y tratadas con PUT 10 mM (d). Las barras de error escala 10 μ m.

7.1.2-Efecto de las PAs sobre la polimerización de la tubulina semi-purificada

Para analizar este efecto y ver la interacción de las PAs con los MT durante su formación se tomaron muestras de tubulina semi-purificada y se pusieron en contacto con PUT o SPD a dos concentraciones diferentes, 0,1 y 7,5 mM, bajo condiciones de polimerización. Las muestras, conteniendo tubulina semi-purificada y bajo condiciones de

polimerización, debían incrementar su absorbancia a 350 nm como resultado del acoplamiento de los monómeros (ver apartado 16.2 (*Polimerización in vitro* de MT en presencia de PAs) de Material y Métodos.

En la Figura 112 puede observarse este comportamiento en el caso de la muestra control, en ausencia de PAs, donde el valor de absorbancia incrementa desde 0 hasta aproximadamente 0,005 unidades de absorbancia a lo largo de los 150 min de

ensayo. Sin embargo, en presencia de PUT 0,1 mM y, aún más notablemente, en presencia de PUT 7,5 mM, la absorbancia presentó valores siempre por debajo del control, lo que fue traducido como una menor polimerización de la tubulina. Sorprendentemente, en presencia de concentraciones elevadas de SPD, la polimerización incrementó con la PA. Al final de la incubación los valores de absorbancia se habían multiplicado por cinco en presencia de SPD 7,5mM.

Figura 112

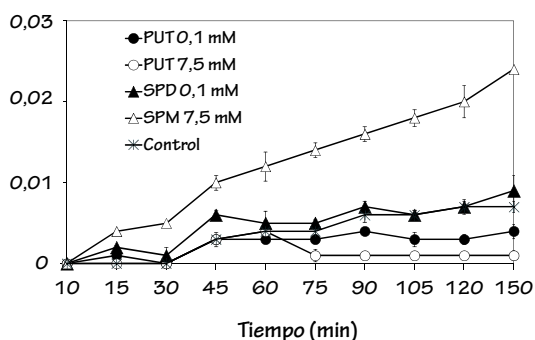


Figura 112. Valoración de la polimerización de tubulina semi-purificada como incremento de la absorbancia a 350 nm en tampón polimerizante en ausencia (control) o en presencia de PUT o SPD (0,1 y 7,5 mM) a lo largo del tiempo (0-150 min). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

7.1.3-Efecto de las PAs sobre la condensación nuclear

Con el fin de detectar alteraciones en el nivel de condensación del material nuclear como

señal indirecta de despolimerización microtubular debida a la acción de las PAs, se incubaron las teliosporas en presencia de éstas. Los resultados se muestran en las Figuras 113 y 114.

Figura 113

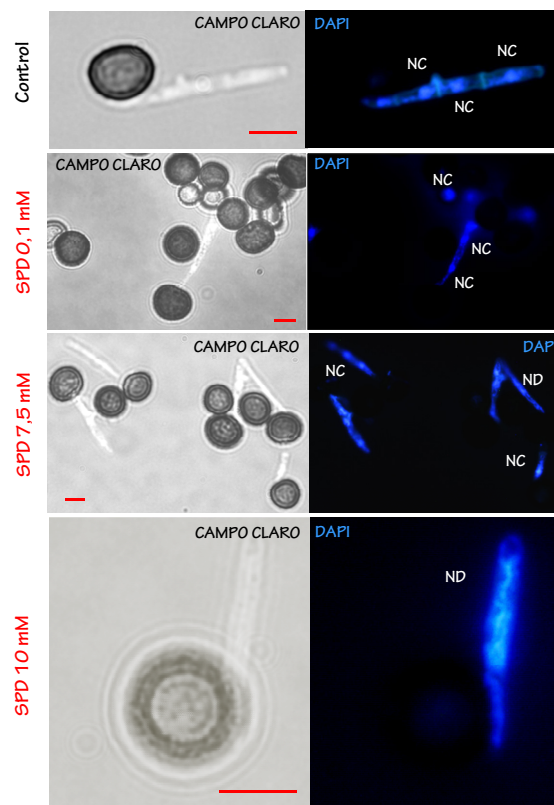


Figura 113. Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia correspondientes a células no tratadas (control) o tratadas con concentraciones crecientes de SPD (0,1 mM-10 mM) y posteriormente marcadas con DAPI para la localización de su material nuclear. Pueden observarse las imágenes en campo claro y sus correspondientes en fluorescencia. La barras de escala indican 5 µm. (NC, núcleo condensado; ND, núcleo descondensado).

Figura 114

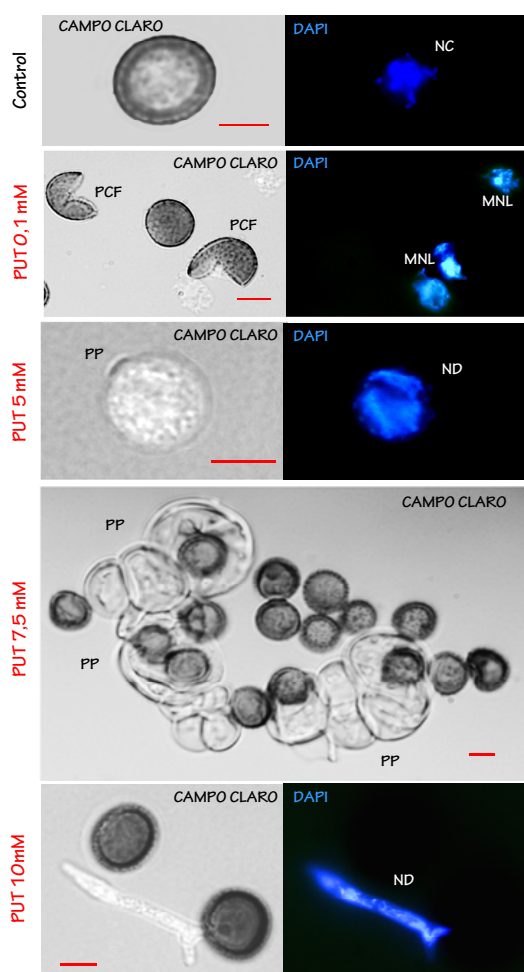


Figura 114. Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia correspondientes a células no tratadas (control) o tratadas con concentraciones crecientes de PUT (0.1 mM-10 mM) y posteriormente marcadas con DAPI para la localización de su material nuclear. Pueden observarse las imágenes en campo claro y sus correspondientes en fluorescencia. La barras de escala indican 5 μ m. (NC, núcleo condensado; PCF, pared celular fragmentada; MNL, material nuclear liberado; PP, protoplasto; ND, núcleo descondensado).

En la Figura 113 se muestra cómo el material nuclear de las teliosporas solo

apareció alterado tras la incubación en presencia de altas concentraciones de SPD. En presencia de esta PA las teliosporas aparecieron germinadas en muchos casos.

Por el contrario, se evidenciaron diferencias importantes en la localización del material nuclear tras la incubación con PUT, incluso a bajas concentraciones de la diamina (Figura 114). Además de la descondensación nuclear en las muestras tratadas, se detectó en ellas una escasa germinación. Muchas teliosporas aparecieron desprovistas de pared celular, en forma de protoplastos, y en muchos casos quedó registrada la fragmentación, no casual, de la pared celular, que causaba la liberación del contenido celular al medio.

7.2-SEPARACIÓN POR CE DE PAs PRODUCIDAS POR TELIOSPORAS DE *S. scitamineum* EN PRESENCIA O EN AUSENCIA DE HMMG

Se analizaron los niveles de PAs existentes en las teliosporas (fracción interna) y liberados al medio de incubación (fracción segregada) tras 3 h de contacto de las células con las glicoproteínas HMMG producidas por plantas inoculadas (I) y control (C) de los dos cvs. (My 55-14 y B 42231). Un control fue realizado, sustituyendo agua destilada por las HMMG en la incubación. Las diferentes fracciones

de PAs libres o conjugadas fueron obtenidas según describe el apartado 6 (*Extracción de PAs producidas por las teliosporas de S. scitamineum*) y separadas mediante CE según se detalla el protocolo del apartado 7 (*Separación de PAs por electroforesis capilar*) de Material y Métodos.

El tampón utilizado como electrolito, conteniendo éter de corona (18-corona-6), daba señal de cuatro picos utilizando una detección indirecta a 200 nm, como muestra el electroferograma de la Figura 115.

Figura 115

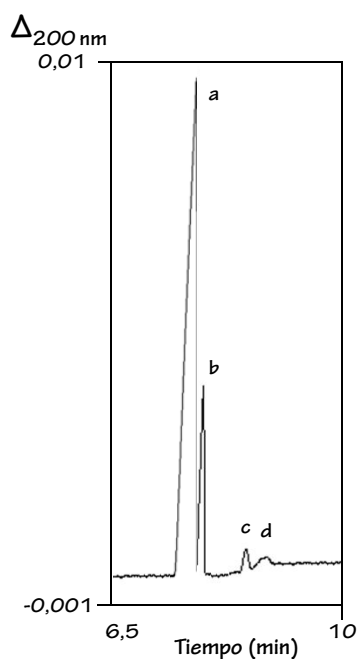


Figura 115. Electroferograma obtenido mediante CE correspondiente a una inyección del tampón utilizado como electrolito. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 7 de Material y Métodos.

La Figura 116 muestra la separación de una mezcla de patrones comerciales de PUT, SPD y SPM, cada uno a concentración $0,033 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El tiempo de migración de las tres PAs osciló entre 6,8 y 9,5 min. Aunque las tres PAs se encontraban a la misma concentración, el área del pico resultante tras su detección no fue igual para las tres, debido a las diferencias estructurales de cada molécula. Las ecuaciones de las rectas de calibrado de cada PA, empleando concentraciones crecientes entre $0,78$ y $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ son representadas en la Figura 117.

Figura 116

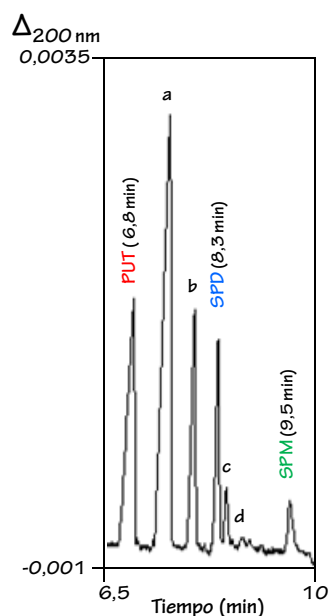


Figura 116. Electroferograma obtenido mediante CE correspondiente a la inyección de una mezcla de patrones comerciales (PUT, SPD y SPM), cada uno a concentración $0,033 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. a, b y c señalan los picos del tampón electrolito. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 7 de Material y Métodos.

Figura 117

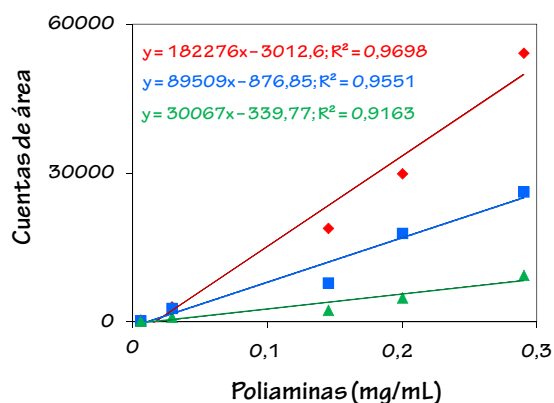


Figura 117. Ecuaciones correspondientes a las rectas de calibración de las PAs comerciales (PUT, SPD y SPM) realizadas a partir de concentraciones variables de cada uno de ellas.

La Figura 118 muestra la separación de una muestra correspondiente a las PAs conjugadas e insolubles en ácido (fracción PH) obtenida a partir de teliosporas previamente incubadas en presencia de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14, donde, entre los 6,5 y 10 min, se detectó la presencia de las tres PAs.

En la Figura 119 se muestran los resultados correspondientes a los niveles de PAs (PUT, SPD y SPM) producidos por las teliosporas tras una incubación de 3 h con las glicoproteínas HMMG de ambos cvs. en ausencia (C) o en presencia de inoculación (I). Se valoró tanto la cantidad de PAs en el interior de las teliosporas como la segregada al medio de incubación. Para cada una de las fracciones se hizo distinción entre PAs libres solubles en ácido (fracción

S) y PAs conjugadas, bien insolubles (PH) bien solubles en ácido (SH). Estas últimas no fueron detectadas en ningún caso (resultados no mostrados).

Figura 118

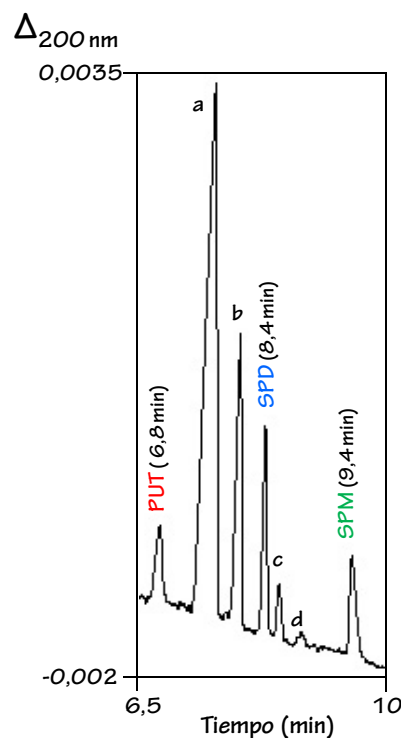


Figura 118. Electroferograma obtenido mediante CE, correspondiente a la inyección de una muestra que contenía las PAs conjugadas e insolubles en ácido (fracción PH) de la fracción interna de teliosporas previamente incubadas en presencia de HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14. a, b y c señalan los picos del tampón electrolito. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 7 de Material y Métodos. Los picos obtenidos tras la separación se identificaron con PUT, SPD y SPM.

Se detectó la presencia de PUT y SPD (y no SPM) en las fracciones interna y segregada de las esporas control, incubadas en ausencia de PAs. En este caso, las PAs fueron únicamente encontradas en su forma soluble, no habiendo PAs conjugadas en ninguna de las dos fracciones. La cantidad total de PAs producido por las teliosporas control fue aproximadamente de 0,5 mg·mg de espora⁻¹.

La incubación de las teliosporas con HMMG del cv. My 55-14 provocó modificaciones en el patrón de producción de PAs. La presencia de glicoproteínas producidas tanto por las plantas no inoculadas (C) como por las inoculadas (I) aumentó los niveles totales de PAs (hasta 1,5 y 2,5 mg·mg de espora⁻¹, respectivamente) en relación al control.

Sin embargo, aunque la presencia de ambos tipos de HMMG del cv. resistente favorecieron el aumento en los niveles generales de PAs, éstos no incrementaron de igual manera en relación a las distintas fracciones analizadas. Tras la incubación de las teliosporas con HMMG de My 55-14 (C) se detectaron altos niveles de las tres PAs analizadas (incluida la SPM) en la fracción interna insoluble, lo cual no ocurrió en ningún otro análisis. Por el contrario, en presencia de HMMG de My 55-14 (I) el aumento general de PAs se debió a un incremento

considerable de las PAs contenidas en la fracción segregada.

Es interesante que los niveles de PAs encontrados tras la incubación de las teliosporas con HMMG de plantas inoculadas y no inoculadas del cv. B 42231 fueron muy similares a los encontrados en el control. No se detectó un aumento de los niveles generales de PAs, como ocurría en presencia de glicoproteínas de plantas de My 55-14, llegando incluso a disminuir hasta casi un 40% en presencia de HMMG del cv. sensible.

8-LOS LIGNANOS COMO METABOLITOS DEFENSIVOS PRODUCIDOS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN

Con el fin de conocer más exhaustivamente el contenido de las glicoproteínas de defensa producidas por las plantas de caña de azúcar, éstas se sometieron a una nueva separación electroforética en PAGE-SDS y las bandas obtenidas tras la separación fueron analizadas por espectrometría de masas (ESI-Q-Q-TOF), según el protocolo descrito en el apartado 14.3 (PAGE-SDS y análisis por espectrometría de masas de las fracciones HMMG y MMMG) de Material y Métodos.

8.1-NIVELES DE PROTEÍNA DIRIGENTE (DIR) Y DE LA ENZIMA CINAMIL ALCOHOL DESHIDROGENASA (CAD) EN CAÑA

8.1.1-Identificación de proteínas DIR en las glicoproteínas de caña de azúcar

Al menos tres bandas (1, 2, 3) pudieron ser visualizadas por tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética (PAGE-SDS) de las glicoproteínas MMMG producidas por el cv. sensible, B 42231, y seis bandas (4-9) en la separación de MMMG del cv. resistente, My 55-14, (Figura 120 A). Para la fracción de alto peso molecular de las glicoproteínas (HMMG), se visualizaron dos bandas para el cv. susceptible (1, 2) y cuatro (3-6) para el resistente (Figura 120 B).

Figura 120

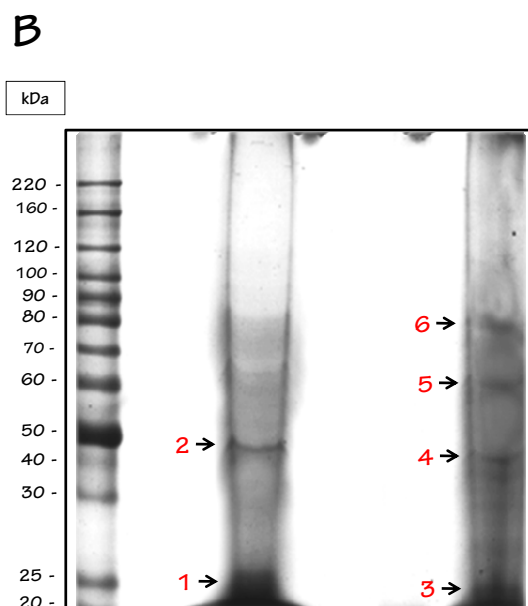
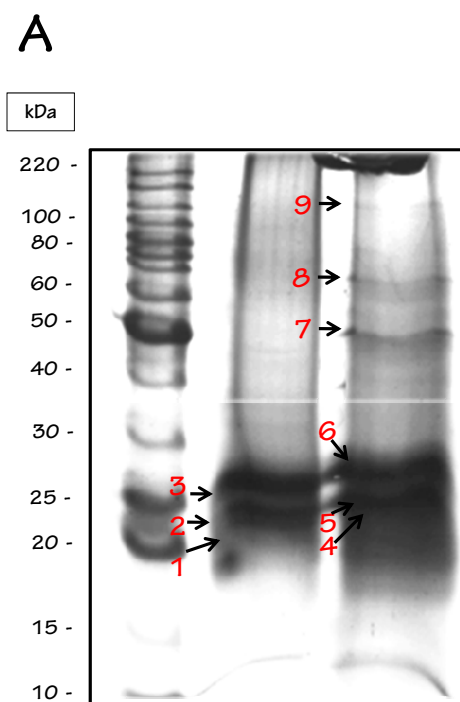


Figura 120. Tinción Coomassie de los geles resultantes tras la separación electroforética de las glicoproteínas MMMG (A) y HMMG (B) de caña de azúcar. Para ambas separaciones: la primera calle corresponde al patrón de pesos moleculares, la segunda a glicoproteínas del cv. sensible (B 42231) y la tercera a glicoproteínas del cv. resistente (My 55-14).

A continuación, cada una de las bandas fue extraída del gel y digerida con tripsina. Los péptidos, separados por cromatografía líquida fueron analizados por espectrometría de masas (ESI-Q-TOF). Para el análisis de los resultados se utilizó el servidor MASCOT y la base de datos no redundante de secuencias de proteínas de NCBI (Frías *et al.* 2010). Los resultados finales del análisis se muestran en la Tabla X. En ella se postula la posible identificación para cada una de las bandas extraídas tras la separación de las glicoproteínas MMMG (Tabla X A) y HMMG (Tabla X B).

Fue interesante que tanto las bandas 1-3 correspondientes a las glicoproteínas MMMG del cv. B 42231, como las bandas 4-6, en las glicoproteínas MMMG del cv. My

55-14, fueron identificadas principalmente como proteínas dirigentes (DIR) o similares a DIR de *Saccharum hybrid*, con una masa molecular de aproximadamente 2000 kDa.

Tabla X

A

Banda	Cultivar	Fracción	Código de acceso de la proteína	Descripción de la proteína	Origen	MM	Puntuación	Cobertura
1	B42231	MMMG	gi 262285778	<i>dirigent-like protein</i>	<i>Saccharum hybrid</i>	20269	115 > 57	11%
1	B42231	MMMG	CF577328	Sugarcane Stem Lambda ZIPLOX Library (MCS) <i>Saccharum hybrid</i> cultivar Q117 cDNA clone MCSA211A08 5' similar to <i>dirigent</i> , mRNA sequence.	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	18997	64 ≥ 64	6%
2	B42231	MMMG	gi 262285778	<i>dirigent-like protein</i>	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP72-1210	20269	84 > 57	11%
2	B42231	MMMG	BQ535820	<i>Saccharum officinarum</i> cDNA 5', mRNA sequence.	<i>Saccharum officinarum</i>	21782	84 > 64	10%
3	B42231	MMMG	gi 42454402	<i>putative dirigent protein</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	20509	99 > 57	13%
3	B42231	MMMG	gi 1568639	Cu/Zn superoxide dismutase	<i>Triticum aestivum</i>	20424	71 > 57	13%
3	B42231	MMMG	BQ535820	<i>Saccharum officinarum</i> cDNA 5', mRNA sequence.	<i>Saccharum officinarum</i>	21782	115 > 65	10%
4	My55-14	MMMG	gi 262285778	<i>dirigent-like protein</i>	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP72-1210	20269	97 > 45	11%
4	My55-14	MMMG	gi 37700483	<i>dirigent</i>	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar Q117	20199	54 > 45	5%
4	My55-14	MMMG	BQ535820	<i>Saccharum officinarum</i> cDNA 5', mRNA sequence.	<i>Saccharum officinarum</i>	21782	94 > 64	10%
5	My55-14	MMMG	gi 262285778	<i>dirigent-like protein</i>	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP72-1210	20269	102 > 45	11%
5	My55-14	MMMG	gi 37700483	<i>dirigent</i>	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar Q117	20199	49 > 45	5%
5	My55-14	MMMG	BQ535820	<i>Saccharum officinarum</i> cDNA 5', mRNA sequence.	<i>Saccharum officinarum</i>	21782	102 > 64	10%
6	My55-14	MMMG	gi 262285778	<i>dirigent-like protein</i>	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP72-1210	20269	61 > 45	11%
6	My55-14	MMMG	CA279360	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar SP80-3280 cDNA clone SCBFLB2093B08 5', mRNA sequence.	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	27422	158 > 64	18%
7	My55-14	MMMG	unidentified					
8	My55-14	MMMG	gi 226496089	cysteine protease 1	<i>Zea mays</i>	51927	76 > 45	3%
9	My55-14	MMMG	gi 68655500	methionine synthase 2 enzyme	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	84717	89 > 45	2%

B

Banda	Cultivar	Fracción	Código de acceso de la proteína	Descripción de la proteína	Origen	MM	Puntuación	Cobertura
1	B42231	HMMG	gi 262285778	dirigent-like protein	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP72-1210	20269	106 > 57	2%
1	B42231	HMMG	BQ535820	<i>Saccharum officinarum</i> cDNA 5', mRNA sequence	<i>Saccharum officinarum</i>	21782	106 > 65	10%
2	B42231	HMMG	gi 319791857	porin	<i>Variovorax paradoxus</i>	42963	246 > 57	10%
3	My55-14	HMMG	gi 37700483	dirigent	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar Q117	20199	62 > 57	5%
3	My55-14	HMMG	gi 262285778	dirigent-like protein	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP72-1210	20269	59 > 45	11%
4	My55-14	HMMG	gi 319791857	porin	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	42963	221 > 57	11%
4	My55-14	HMMG	gi 239814092	porin	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	40603	181 > 57	9%
5	My55-14	HMMG	gi 226506854	prolyl carboxypeptidase like protein	<i>Zea mays</i>	56763	198 > 44	8%
5	My55-14	HMMG	gi 115482892	O510g0511400	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group	56450	191 > 44	7%
5	My55-14	HMMG	gi 242058825	hypothetical protein SORBIDRAFT_O3g035680	<i>Sorghum bicolor</i>	57702	133 > 44	4%
5	My55-14	HMMG	gi 169777	beta-amylase	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group	55400	113 > 44	5%
5	My55-14	HMMG	gi 326502560	predicted protein	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	55378	93 > 44	3%
5	My55-14	HMMG	gi 10140734	putative serine peptidase	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group	56771	46 > 44	1%
6	My55-14	HMMG	gi 2654210	heat shock 70 protein	<i>Spinacia oleracea</i>	72558	48 > 45	1%

Tabla X. Identificación de las proteínas contenidas en MMMG (A) y HMMG (B) por búsqueda en las bases de datos NCBI con el servidor MASCOT. Para cada una de las bandas se identificaron varias posibles proteínas, de las que se indica su código de acceso, su descripción, el origen, la masa molecular, la puntuación y la cobertura.

Las bandas 7-9, obtenidas tras la separación electroforética de las glicoproteínas MMMG del cv. My 55-14 (ver Tabla X), no aparecieron en el cv. sensible. La banda 7 no fue identificada, mientras que las bandas 8 y 9 parecían corresponderse, respectivamente, con una cisteína proteasa de *Zea mays* y con una metionina sintasa de *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*.

Para las glicoproteínas de la fracción de alto peso molecular, HMMG (ver Tabla X B), las bandas 1 y 3, se identificaron de nuevo como proteínas dirigentes (DIR) o semejantes a DIR del cultivar CP72-1210 de *Saccharum hybrid*. Las bandas 2 y 4, a su vez, se relacionaron con posibles porinas. La banda 5 se identificó con una proteína similar a una propil carboxipeptidasa, una serina peptidasa, una β -amilasa o una

hipotética proteína SORBIDRAFT_O3g035680, todas ellas de la familia de las poáceas, al igual que la proteína Hsp 70 de choque térmico, identificada como la banda 6.

8.1.2-Variación en los niveles de expresión de los genes *SofDIR16* y *SofCAD* en caña de azúcar tras su inoculación

Tras haberse revelado la presencia de proteínas dirigentes (DIR) en las glicoproteínas defensivas de caña de azúcar (HMMG y MMMG) y habiéndose comprobado que la producción de estas glicoproteínas estaba relacionada con la resistencia durante las primeras etapas de la infección, se valoró la existencia de variaciones en los niveles de expresión de las proteínas DIR en plantas de caña de azúcar tras la inoculación con el patógeno. Paralelamente se analizó en nivel de expresión de la enzima cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), clave también en la ruta de producción de lignina/lignanós, dado que ambas proteínas están secuencialmente relacionadas. CAD proporciona monolignoles que dimerizan en diferentes estereoisómeros cuyo destino será dirigido por las proteínas DIR.

Los niveles de transcritos de los genes *SofCAD* y *SofDIR16* fueron cuantificados en tejido meristemático (Figura 121 y 123) y foliar (Figuras 122 y 124) de caña de azúcar mediante RT-PCR

cuantitativa siguiendo el protocolo descrito en el apartado 15 (*Cuantificación de los niveles de expresión de los genes codificantes para CAD y proteínas DIR*) de Material y Métodos.

Los niveles de expresión de los genes de las proteínas DIR y CAD en los meristemos fue valorado para ambos cvs., My 55-14 y B 42231, en distintas condiciones: a) en plantas no inoculadas (control), b) en plantas inyectadas con agua o c) en plantas inoculadas con esporidios del patógeno. Para todos los casos, se cuantificó el nivel de expresión a las 3 y a las 6 h post-inoculación. Los niveles de expresión de *SofDIR16* y *SofCAD* en el tejido foliar fueron evaluados de la misma manera, pero únicamente pasadas 6 h desde la inoculación.

Los niveles basales del transcrito *SofCAD* en el meristemo fueron hasta tres veces superiores en el cv. resistente por comparación con el sensible (Figura 121). Se observó además que estos niveles descendían en el cv. My 55-14 tras la inoculación con el patógeno, un 40% a las 3 h y alrededor de un 70% tras 6 h de la inoculación. La inyección con agua también produjo una disminución similar en la expresión del gen. Un descenso en la expresión de *SofCAD* también fue observada en los meristemos de las plantas del cv. susceptible.

Figura 121

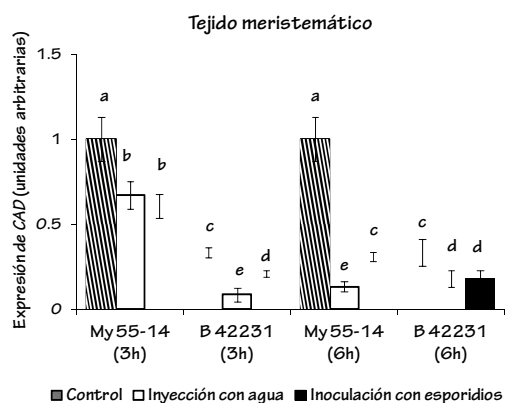


Figura 121. Análisis de la expresión genética, mediante PCR cuantitativa (qPCR), de *SofCAD* en tejido meristemático de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 3 ó 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Resultó interesante que en plantas control, no inoculadas, del cv. resistente, se observara un gradiente de expresión para *CAD* a lo largo de las tres secciones foliares: de mayor a menor desde la zona basal hasta la región apical (Figura 122 A). La inoculación con esporidios provocó una disminución de la expresión de *CAD* en las tres secciones foliares en la variedad resistente, de la misma manera que ocurría en el tejido meristemático. La inyección con

agua produjo una disminución semejante en las secciones media y apical.

Figura 122

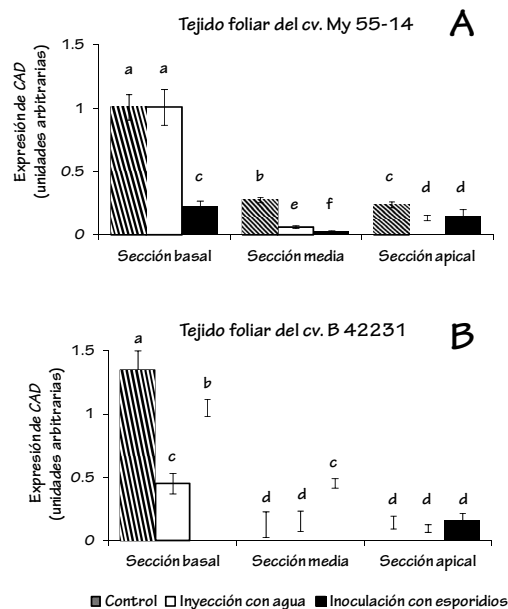


Figura 122. Análisis de la expresión genética, mediante qPCR de *SofCAD* en tejido foliar de plantas de los cvs. My 55-14 (A) y B 42231 (B) de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Las secciones apical y media de las hojas en las plantas control, no inoculadas, de B 42231 también contenían menores niveles de expresión del transcrito en relación a la sección basal (Figura 122 B) y esta última presentó mayores niveles de expresión que la misma sección en el cv.

resistente. Las inyecciones con agua y las inoculaciones con esporidios de plantas del cv. susceptible produjeron una represión de la expresión del gen únicamente en la sección basal (de un 67% y de un 23%, respectivamente) mientras que un incremento del 70% en los niveles de expresión fue observado tras la inoculación con el patógeno en las secciones centrales de las hojas. Ninguna variación fue observada en la sección apical.

Los resultados en relación a la qPCR cuantitativa realizada para la valoración de los niveles de expresión de *SofDIR16* en los meristemos y en las diferentes secciones foliares se muestran en las Figuras 123 y 124. En primer lugar, se observó que la expresión constitutiva de *SofDIR16* en el tejido meristemático de plantas control, no inoculadas, era mayor en el cv. resistente que en cv. susceptible (Figura 123). En B 42231, la expresión incrementó en el tejido meristemático 3 h después de la inoculación con el patógeno, mientras que disminuyó aproximadamente 100 veces en My 55-14. La misma tendencia fue observada en el análisis realizado 6 h después de la inoculación. La expresión de *DIR16* sufrió una reducción del 40% en el cv. resistente y un incremento del 50% en el susceptible tras la infección experimental.

La inyección con agua tuvo un efecto diferente sobre el nivel transcripcional de *SofDIR16* en función del tiempo trascurrido

desde la inoculación hasta el análisis, ya que se redujo durante las 3 primeras horas y se estimuló enormemente durante las 3 h siguientes en ambas variedades, alcanzando niveles hasta 290 y 780 veces superiores para My 55-14 y B 42231, respectivamente.

Figura 123

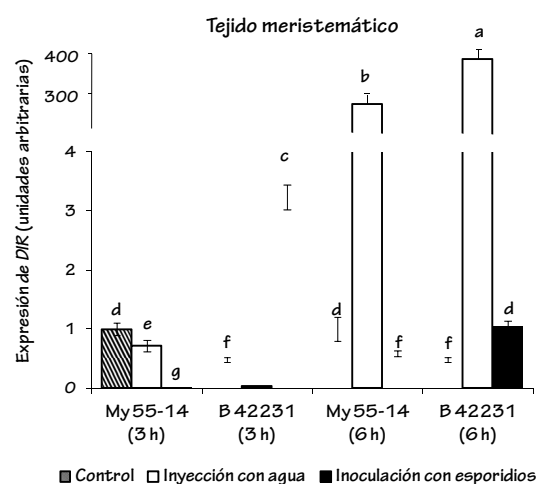


Figura 123. Análisis de la expresión genética, mediante qPCR de *SofDIR16* en tejido meristemático de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 3 ó 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Figura 124

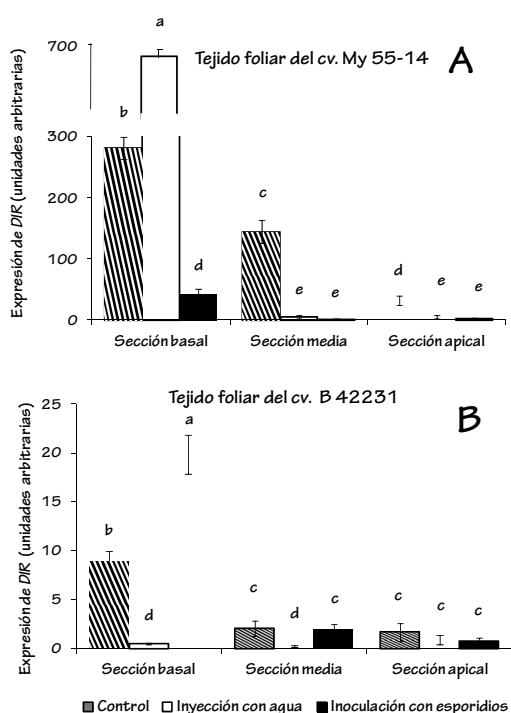


Figura 124. Análisis de la expresión genética, mediante qPCR de *DIR16* en tejido foliar de plantas de los cvs. My 55-14 (A) y B 42231 (B) de *S. officinarum*. Se evaluó la expresión después de 6 h de la inyección con agua o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* y los niveles fueron normalizados al nivel constitutivo de *SofCAD* (control, sin inyección ni inoculación). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones y las letras iguales, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Se observó una reducción gradual en el nivel de transcritos de *SofDIR* a lo largo de la hoja, desde la región basal hacia la apical, en las plantas control del cv. resistente (Figura 124 A). La inoculación con los esporidios compatibles redujo severamente el nivel de expresión en las tres secciones foliares (en un 85%, 99% y 90%, en las

secciones basal, central y apical, respectivamente). La inyección con agua incrementó la expresión únicamente en la sección basal de las hojas, mientras que estimuló una disminución de la expresión en las otras secciones. Las hojas del cv. susceptible presentaban constitutivamente niveles menores de expresión del mismo gen en relación al cv. resistente. Sin embargo, un gradiente decreciente de la expresión de *SofDIR16* fue observado desde la región basal a la más apical, de forma similar a lo observado en el tejido foliar del cv. My 55-14.

La inoculación de las plantas del cv. B 42231 con el patógeno incrementó la expresión de *SofDIR16* en la sección basal de las hojas, mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión en las regiones central y apical en relación a las plantas control. La inyección con agua produjo una disminución acusada de los niveles de expresión del gen. Así, ningún incremento fue observado tras la inoculación con agua en el tejido foliar del cv. susceptible (Figura 124 B).

8.2-IDENTIFICACIÓN DE LIGNANOS EN EL TEJIDO MERISTEMÁTICO Y FOLIAR DE CAÑA DE AZÚCAR POR CZE

A partir de los resultados presentados en el apartado 8.1.2 nos preguntamos lo siguiente: ¿es posible que la reducción en la

expresión del gen *SofDIR16* en el cv. resistente como respuesta a la infección experimental pudiera estar acompañada de un incremento en la concentración de lignanos que tuvieran un efecto citotóxico sobre el desarrollo del patógeno? Así, los lignanos podrían acumularse en los tejidos de las plantas resistentes y desempeñar un papel defensivo evitando el desarrollo de la infección.

Para confirmar esta hipótesis se llevó a cabo una extracción de los lignanos presentes en el meristemo de caña de azúcar de ambos cvs. mediante el protocolo descrito en el apartado 4 (*Extracción de*

lignanos totales a partir de tejido de caña de azúcar) de Material y Métodos. Una vez extraídos, se procedió a su separación mediante Electroforesis capilar zonal (CZE) según se detalla en el apartado 5 (*Separación de lignanos por electroforesis capilar zonal*) de la sección Material y Métodos.

La Figura 125 muestra la separación por CZE de una mezcla de los cinco patrones de lignanos utilizados (lariciresinol, isolariciresinol, matairesinol, pinioresinol y secoisolariciresinol), cada uno a una concentración de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura 125

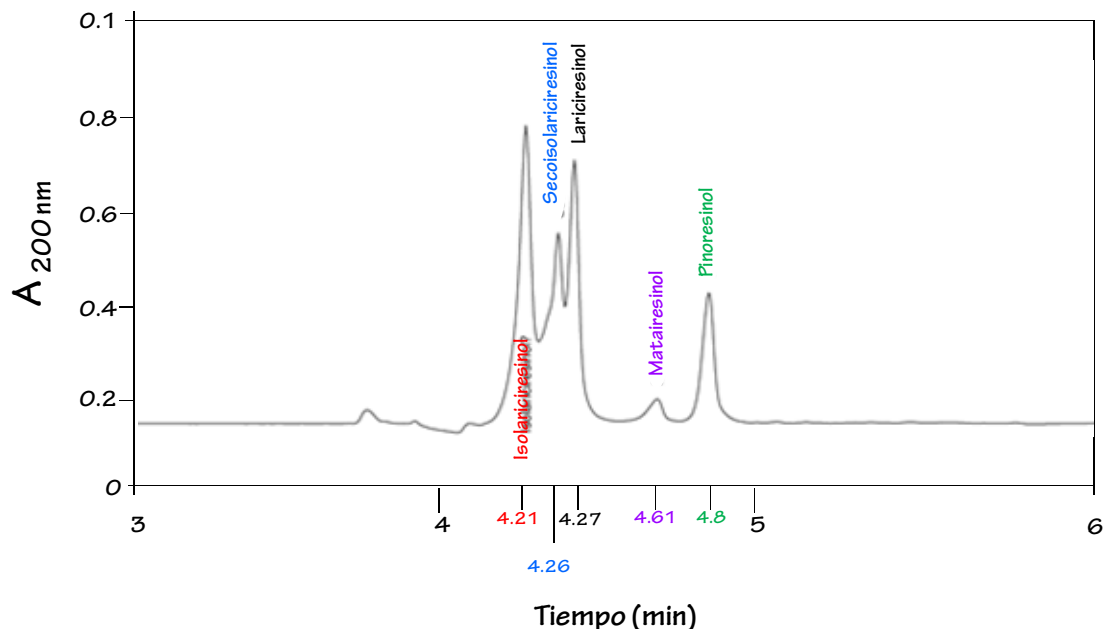


Figura 125. Electroferograma, obtenido por CZE, de la separación de una mezcla de patrones de lignanos ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ cada uno de ellos) entre los 3 y los 6 min. Se indica el tiempo de migración de cada uno de los lignanos separados (isolariciresinol, secoisolariciresinol, lariciresinol, matairesinol, pinioresinol). La detección se realizó a 200 nm. El resto de las condiciones de análisis se describen en el apartado 15.5 de Material y Métodos.

Las rectas de calibración de cada uno de los cinco lignanos, ajustadas por regresión lineal a partir de concentraciones conocidas de cada uno de ellos se muestran en la Figura 126. Las mezclas de lignanos obtenidas a partir de tejido meristemático de caña de azúcar tras la inyección con agua

o la inoculación con esporidios de *S. scitamineum* fueron separadas mediante CZE. En la Figura 127 se presentan los electroferogramas correspondientes a dichas muestras. El análisis cuantitativo de los cinco lignanos identificados se muestra en la Tabla XI.

Figura 126

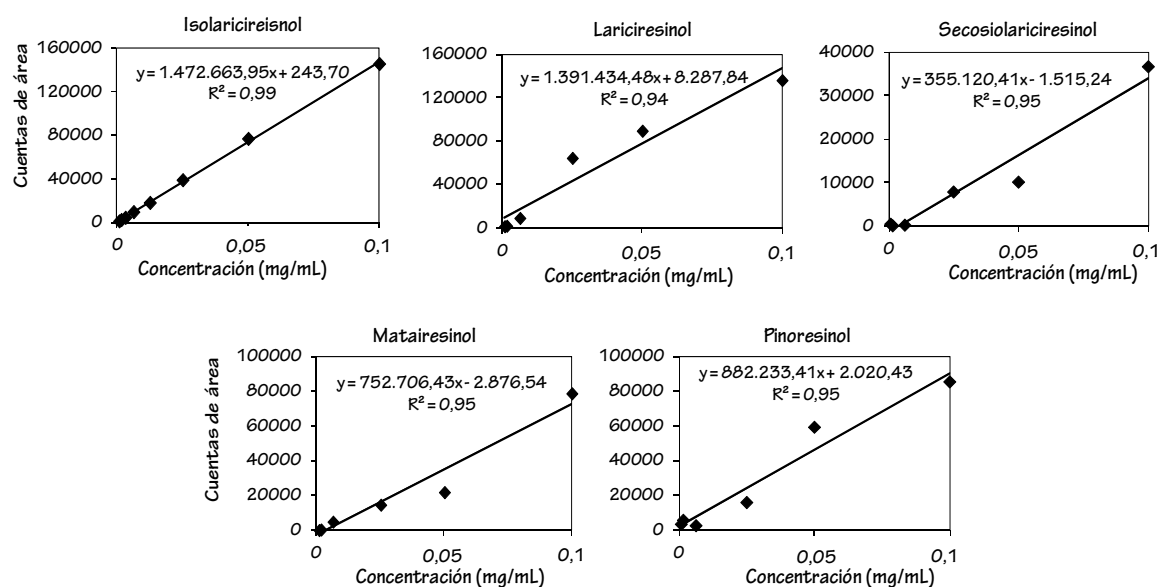


Figura 126. Ecuaciones correspondientes a las rectas de calibración de cada patrón de lignano comercial realizadas a partir de concentraciones variables de cada uno de ellos.

Figura 127

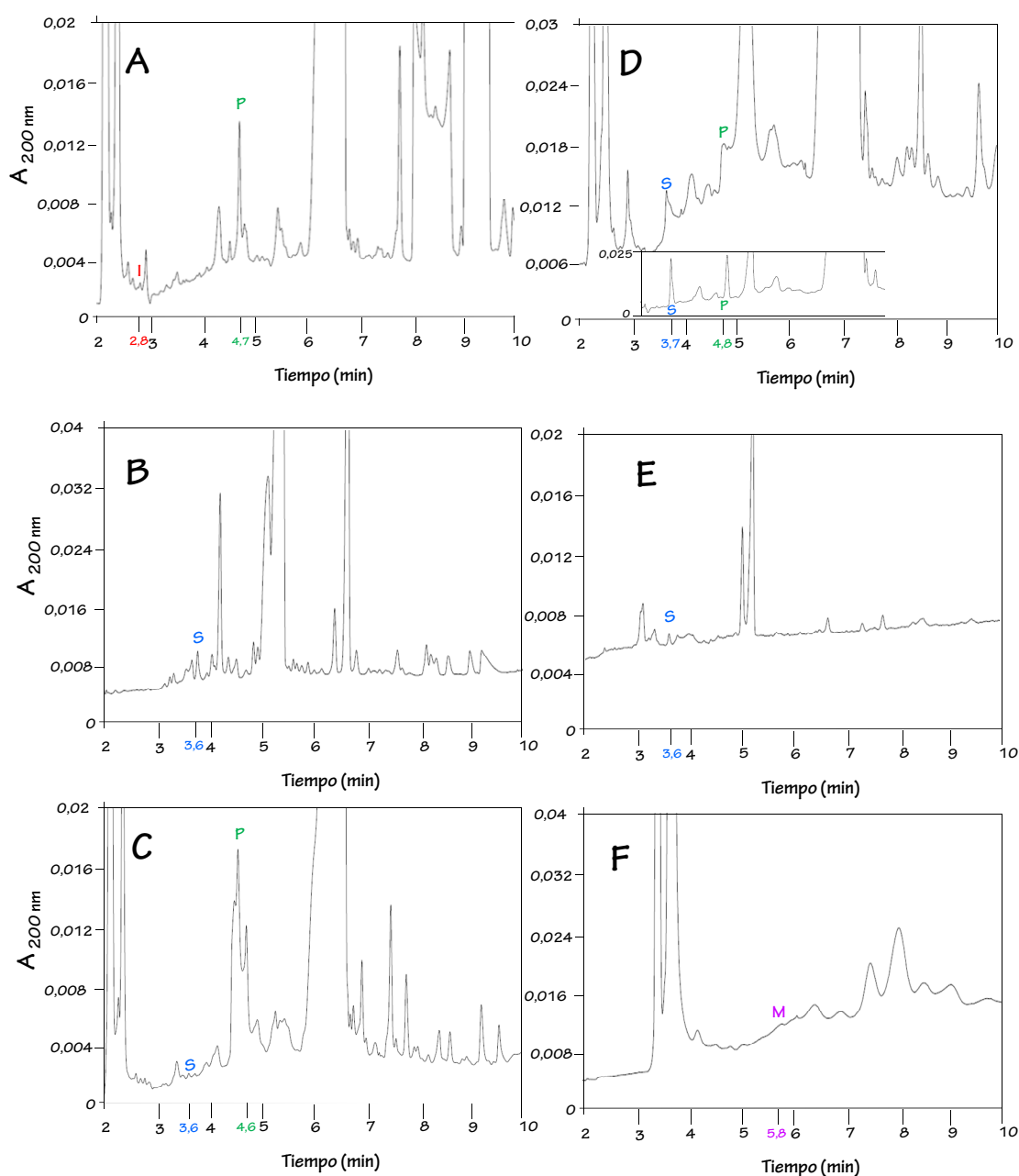


Figura 127. Electroferogramas, obtenidos mediante CZE, de los lignanos aislados a partir del tejido meristemático de caña de azúcar. Se muestra la separación de la mezcla de lignanos obtenida a partir del meristemático de plantas del cv. resistente sin inocular (A), inyectadas con agua (B) o con esporidios conjugantes (C). De igual manera, se presentan los electroferogramas obtenidos a partir de plantas del cv. sensible sin inocular (D), inyectadas con agua (E) o con esporidios (F). En el "inset" de la Figura D se muestra el resultado de la separación del extracto de lignanos obtenido a partir de plantas control del cv. B 42331 tras su cebamiento con 2 μ L de pinosresinol y secoisolariciresinol ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). En cada caso, se indica el lignano que fue detectado, así como su tiempo de migración correspondiente. S, secoisolariciresinol; P, pinosresinol; M, matairesinol; I, isolariciresinol. La detección se realizó a 200 nm. El resto de las condiciones de análisis se describen en el apartado 5.3 de Material y Métodos.

Tabla XI

Tratamiento	Cantidad de lignanos en meristememo de caña de azúcar 6 h después del tratamiento (μg de lignano por gramo de tejido fresco)				
	Isolariciresinol	Lariciresinol	Secoisolariciresinol	Matairesinol	Pinoresinol
My 55-14 (C)	$0,09 \pm 0,01$	0	0	0	$20,5 \pm 2,9$
My 55-14 (A)	0	0	$2,67 \pm 0,28$	0	0
My 55-14 (I)	0	0	$5,23 \pm 0,42$	0	$107,4 \pm 9,5$
B 42231 (C)	0	0	$10,11 \pm 1,01$	0	$7,32 \pm 0,61$
B 42231 (A)	0	0	$2,77 \pm 0,31$	0	0
B 42231 (I)	0	0	0	$8,12 \pm 0,9$	0

Tabla XI. Niveles de isolariciresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol y pinoresinol detectados en el tejido meristemático de plantas de caña de azúcar del cv. resistente (My 55-14) y sensible (B 42231) no inoculadas (control, C), inyectadas con agua (A) o inoculadas con el patógeno (I). La cuantificación es expresada como μg de lignano por gramo de tejido fresco.

En la Tabla XI se presenta la cantidad de los lignanos detectados en el tejido meristemático de caña de azúcar 6 h después de los distintos tratamientos. Destacó la presencia de secoisolariciresinol y pinoresinol en las muestras analizadas. En el cv. resistente, la presencia de secoisolariciresinol apareció tras la inyección o la inoculación, sobre todo tras el contacto con el patógeno. Sin embargo, se observó el efecto contrario en el cv. susceptible, donde los niveles de secoisolariciresinol (que eran constitutivamente de $10\text{-}11 \mu\text{g}\cdot\text{g}$ de tejido⁻¹) disminuyeron un 75% tras la inyección de las plantas con agua, desapareciendo completamente tras la infección con el patógeno.

También se observó un comportamiento contrario en relación a los niveles de pinoresinol entre variedades. El lignano incrementó hasta un 80% en los meristemas de las plantas del cv. resistente que habían sido inoculadas con el patógeno, en relación al control, mientras que la baja cantidad de pinoresinol detectada en las plantas no inoculadas del cv. B 42231 desapareció totalmente tras la inoculación. En ambas variedades no fue manifestada la presencia de pinoresinol tras la inyección con agua.

El lariciresinol no fue detectado en el tejido meristemático de caña de azúcar ni en plantas control ni en plantas tratadas. Únicamente $0,09 \mu\text{g}\cdot\text{g}$ de tejido⁻¹ de isolariciresinol fueron detectado en plantas no inoculadas del cv. My 55-14 y alrededor

de 8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}$ de tejido⁻¹ de matairesinol aparecieron en plantas del cv. susceptible tras la infección.

Así, el pinoresinol y el secoisolariciresinol fueron considerados como los posibles lignanos implicados en la respuesta citotóxica desencadenada por el descenso de la expresión de las proteínas DIR tras la infección por *S. scitamineum*. Por tanto, se realizó un estudio para valorar el desarrollo del patógeno en presencia de ambos lignanos.

8.3- EFECTO DE LOS LIGNANOS SOBRE EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DEL PATÓGENO

8.3.1-Germinación de teliosporas y desarrollo del micelio en presencia de pinoresinol y secoisolariciresinol comerciales

Los ensayos de germinación en presencia de concentraciones crecientes de pinoresinol y secoisolariciresinol (entre 5 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se llevaron a cabo a partir de teliosporas de *S. scitamineum*, incubadas a una concentración de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta 80 h en presencia del lignano correspondiente en tubos eppendorf. Un control, en ausencia de lignano en el medio fue analizado de manera simultánea al resto de tratamientos.

Se tomaron muestras a distintos tiempos de incubación, que se depositaron

en una cámara de Neubauer, valorándose en ellas mediante microscopía óptica el porcentaje de tubos germinativos (gráficos A en las Figuras 128 y 129) y esporidios (B en las Figuras). La germinación total, como resultado de la aparición conjunta de tubos y esporidios es representada en los gráficos C de las mismas Figuras. Además, durante las 80 h de ensayo el desarrollo del patógeno derivó en la aparición de micelio dicariótico, aproximadamente a partir de las 24 h. El momento de aparición y el nivel de significación de éste varió en función del tratamiento aplicado (gráfico D de las Figuras 128 y 129).

Los resultados correspondientes al efecto del pinoresinol sobre la germinación de las teliosporas se muestran en la Figura 128. En ella se observa que, para todos los tratamientos, hubo un pequeño pico en la aparición de tubos germinativos a las 6 h, y un gran pico a las 48 h (A). La presencia de tubos germinativos cayó bruscamente a las 72 h, coincidiendo con el incremento en la formación de micelio dicariótico (D).

La presencia de pinoresinol a una concentración de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pareció afectar negativamente a la formación de tubos germinativos ya que los niveles de emergencia de los tubos a partir de las teliosporas se mantuvieron por debajo del control. Sin embargo, justo a las 48 h, estos niveles sobrepasaron de manera

evidente los del control y del resto de tratamientos. Algo similar, pero en menor medida, ocurrió en presencia de pinosresinol $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, donde el pico de máxima formación de tubos germinativos pareció ensancharse, indicando que la producción de tubos se prolonga más en el tiempo. Esto deriva en una mayor liberación de esporidios hasta las 56 h (B) y en un incremento en el porcentaje de germinación total (C) en presencia de pinosresinol a una concentración de 20 y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La aparición de esporidios se vio fuertemente afectada para tiempos largos de incubación (80 h) en presencia de pinosresinol $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, disminuyendo desde un 80% hasta un 30%, lo que afectó directamente al porcentaje general de germinación, que también se vio disminuido (C). Sorprendentemente, la aparición de tubos germinativos no se vio significativamente alterada por la presencia de pinosresinol $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A).

A pesar de que las altas concentraciones de pinosresinol parecían favorecer el desarrollo del patógeno, la aparición del micelio se vio afectada negativamente por la presencia del lignano. Así, mientras que el micelio en la muestra control podía ser ya visualizado a las 24 h, su aparición se retrasó hasta las 48 h en presencia de pinosresinol $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, hasta las 56 h en presencia de las

concentraciones intermedias del lignano (10 y $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incluso hasta las 72 h en presencia de pinosresinol $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El fuerte efecto negativo de este último sobre la aparición del micelio dicariótico debía estar necesariamente relacionado con la disminución en el porcentaje de liberación de esporidios en presencia del lignano (B).

El mismo ensayo fue realizado en presencia de concentraciones crecientes (entre 5 y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de secoisolariciresinol. Los resultados en relación a la aparición de tubos germinativos, esporidios libres y micelio dicariótico se muestran en la Figura 129. En este caso, un primer pico de aparición de tubos germinativos fue visualizado para todos los tratamientos a las 24 h (A). Mientras que este pico descendía en las muestras control y en las incubadas en las concentraciones altas del lignano a las 32 y 48 h, la emergencia de los tubos siguió aumentando en aquellas muestras incubadas en presencia de secoisolariciresinol 5 y $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Un nuevo pico en la formación de tubos germinativos tuvo lugar en la muestra control a las 48 h. Sin embargo, destacó el incremento observado en presencia de secoisolariciresinol $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (entre las 56 y 72 h), $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (a las 72 h), $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (a las 80 h) y, sobre todo, en presencia de secoisolariciresinol $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,

entre las 56 y las 72 h. Este último aumento fue del 50% en relación a la muestra control y su mantenimiento a lo

largo del tiempo derivó en una formación incrementada de esporidios (B) a las 72 h.

Figura 128

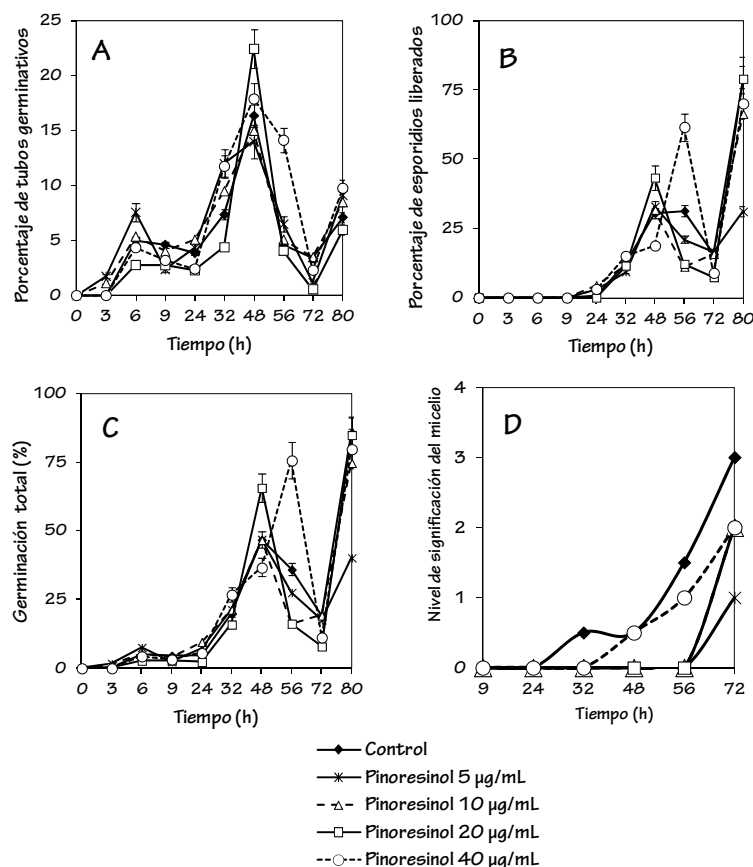


Figura 128. Porcentaje de aparición de tubos germinativos (A) y esporidios libres (B) a partir de teliosporas incubadas en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes de pinoresinol ($5\text{--}40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 80 h de ensayo. El porcentaje de germinación total, consecuencia de la aparición tanto de tubos como de esporidios, se muestra en la Figura C. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Se indica también el nivel de significación (calificado arbitrariamente) del micelio dicariótico encontrado en las muestras en presencia de concentraciones crecientes ($5\text{--}40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinoresinol durante los ensayos de crecimiento del patógeno en sus estadios iniciales (hasta 72 h de incubación). Antes de las 9 h no se apreció la aparición de micelio en ningún caso (D).

Resultó interesante que la presencia en el medio de incubación de

secoisolariciresinol $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ produjera un efecto negativo sobre la liberación de

esporidios (B) aunque éste fue insuficiente para frenar la formación temprana de micelio dicariótico, que ya aparecía a las 24 h. También la concentración más alta del lignano indujo la formación temprana y estimulada de micelio (D), superando los

niveles valorados en la muestra control, cuyo micelio no fue visible hasta las 32 h. Las concentraciones más bajas de secoisolariciresinol tuvieron un efecto negativo sobre la aparición de micelio.

Figura 129

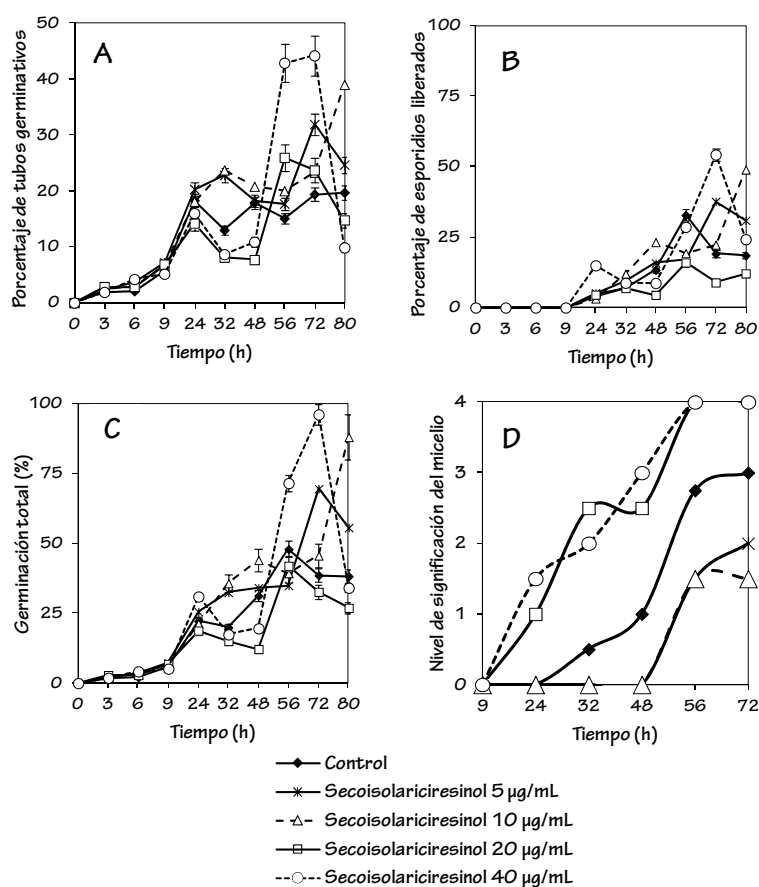


Figura 129. Porcentaje de aparición de tubos germinativos (A) y esporidios libres (B) a partir de teliosporas incubadas en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes de secoisolariciresinol (5-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 80 h de ensayo. El porcentaje de germinación total, consecuencia de la aparición tanto de tubos como de esporidios, se muestra en la Figura C. Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones. Se indica también el nivel de significación (calificado arbitrariamente) del micelio dicariótico encontrado en las muestras en presencia de concentraciones crecientes (5-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinosresinol durante los ensayos de crecimiento del patógeno en sus estadios iniciales (hasta 72 h de incubación). Antes de las 9 h no se apreció la aparición de micelio en ningún caso (D).

La morfología de muchos de los tubos germinativos y esporidios formados se vio alterada por la presencia de los lignanos durante la incubación (Figura 130). Aparecieron estructuras más grandes y deformadas tras la incubación con

pinoresinol (C1, C2, C3, C6) y con secoisolariciresinol (B1, B2) aunque alguna de estas estructuras, de forma muy aislada, fue también encontrada en la muestra control (A2).

Figura 130

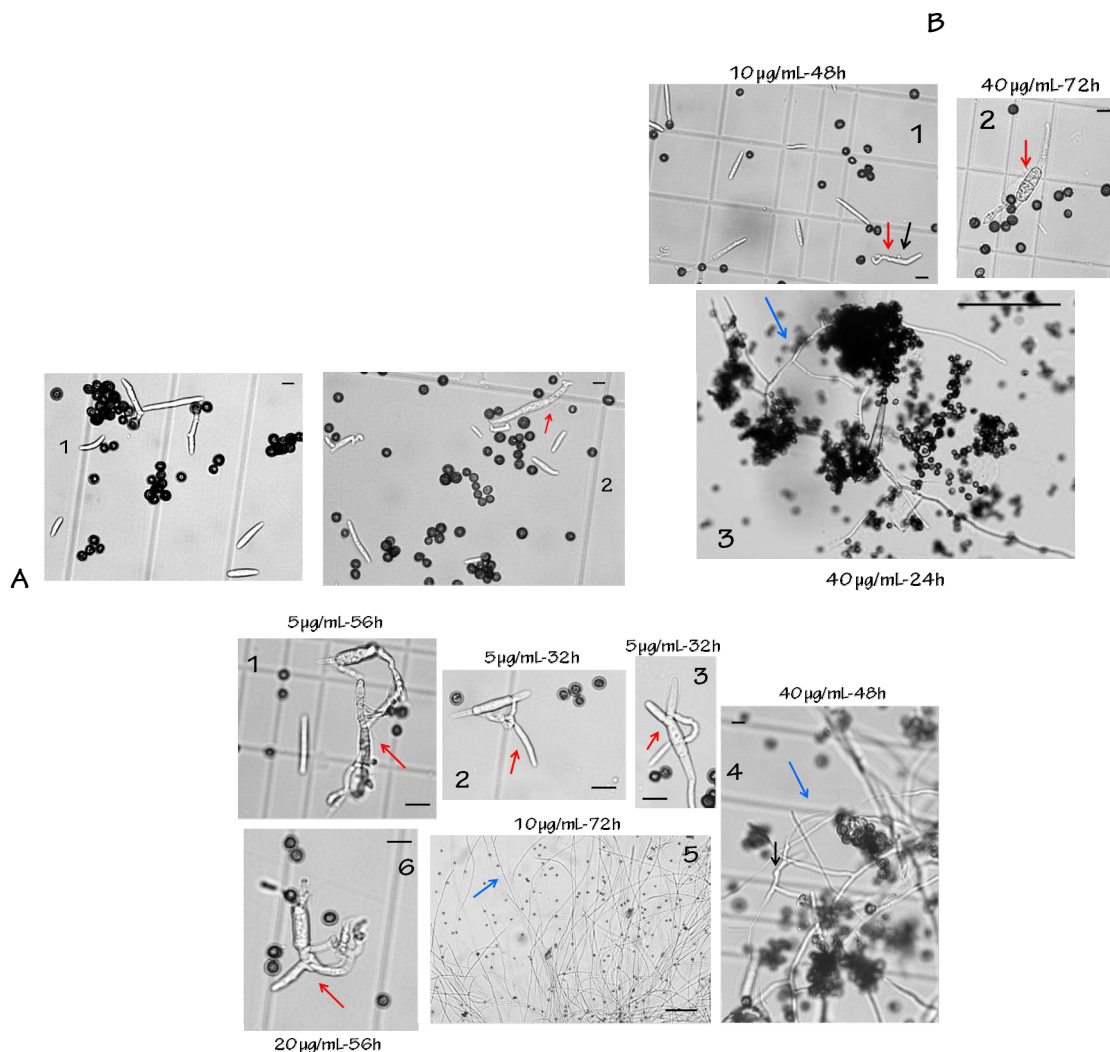


Figura 130. Micrografías tomadas al microscopio óptico de las teliosporas de *S. scitamineum* incubadas en ausencia (A, control) o en presencia de concentraciones crecientes ($5-40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de secoisolariciresinol (B) o pinoresinol (C). Las fotografías fueron tomadas durante los ensayos de germinación realizados en cámara de Neubauer (Figuras 128 y 129). Las flechas rojas señalan la aparición en el medio de esporidios con morfología alterada y las azules muestran la presencia de micelio dicariótico. Las barras de escala indican $10 \mu\text{m}$ en A1, A2, B4, C1 y C2, $20 \mu\text{m}$ en B1, B2, B3 y B6 y $100 \mu\text{m}$ en B5 y C3.

Finalmente, una muestra de la mezcla de teliosporas y esporidios que se encontraban incubados en presencia de pinoresinol y secoisolariciresinol $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fue tomada a las 56 h de la incubación para la tinción de las células con safranina, con el fin de observar la existencia de alteraciones en su material nuclear que pudieran relacionarse con el efecto nocivo de los lignanos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 131.

De nuevo pudieron ser visualizadas numerosas alteraciones morfológicas en los esporidios incubados en presencia de secoisolariciresinol $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D, E en la Figura) y pinoresinol $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B, C), sobre todo en presencia de este último. Estas alteraciones hacen referencia a la formación de estructuras poco definidas, de alargamiento excesivo o uniones entre esporidios. En relación a los núcleos, éstos aparecían compactos y claramente marcados en los esporidios de la muestra control (A). La tinción con safranina se localizaba de manera concreta en las regiones nucleares de las células, y el resto del citoplasma se visualizaba transparente. Sin embargo, en presencia de los lignanos, en aquellos esporidios que se encontraban alterados, la tinción aparecía distribuida por toda la arquitectura celular, como si el material nuclear estuviese descondensado por todo el citoplasma.

Figura 131

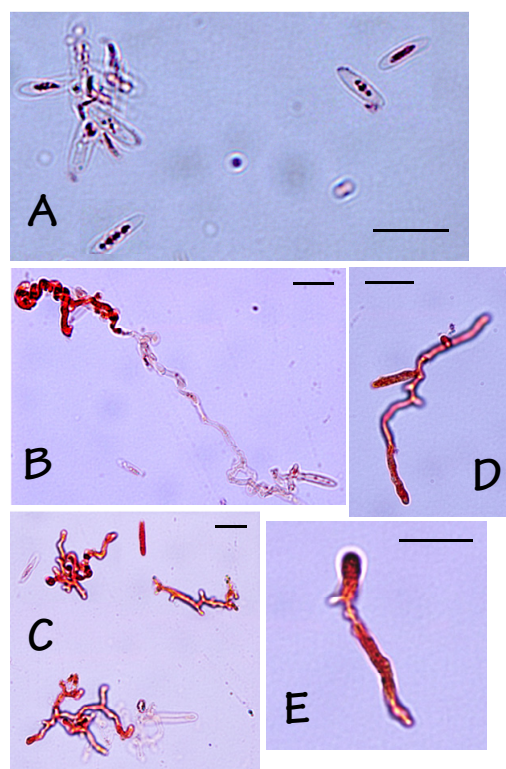


Figura 131. Micrografías tomadas al microscopio óptico correspondientes a esporidios conjugantes (+ y -) de *S. scitamineum* teñidos con safranina, para el marcaje de su material nuclear. Previo al marcaje, los esporidios sexualmente compatibles (+ y -) habían sido incubados conjuntamente en ausencia (A) o en presencia de pinoresinol $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B y C) o secoisolariciresinol $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D y E). Las barras de escala indican $10\ \mu\text{m}$.

8.3.2-Desarrollo de colonias de *S. scitamineum* en presencia de pinoresinol y secoisolariciresinol comerciales

Con el fin de confirmar la hipótesis de que aquellos lignanos cuya producción incrementa en la variedad resistente tras la inoculación ejercen un efecto citotóxico

sobre el desarrollo del patógeno, fueron realizados diversos experimentos sobre el crecimiento de *S. scitamineum* en presencia de lignanos comerciales bajo distintas condiciones.

En la Figura 132 se muestra el crecimiento progresivo de una colonia de esporidios aislados (+) de *S. scitamineum*, a concentración $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹, en medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo concentraciones crecientes de pinoresinol o secoisolariciresinol. En ningún caso se inhibió el crecimiento del patógeno en presencia de pinoresinol (A), aunque se observó un cambio en la morfología de la colonia, que pasaba de rugosa a lisa cuando crecía en altas concentraciones del lignano, a las 72 y las 96 h.

Figura 132

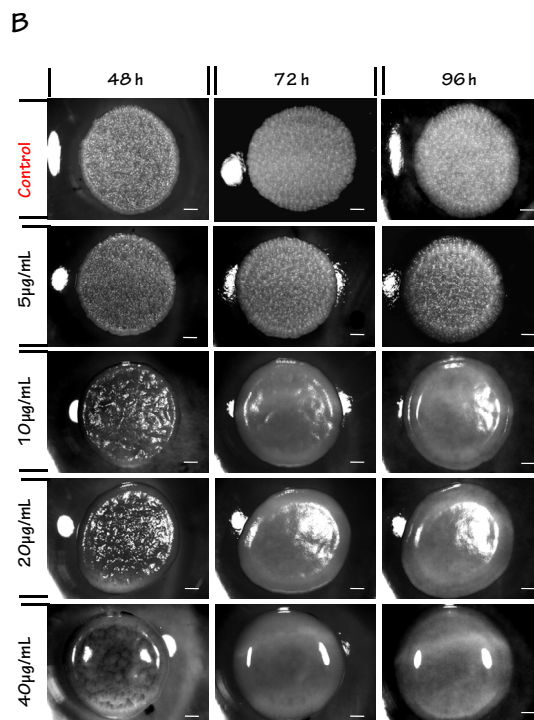
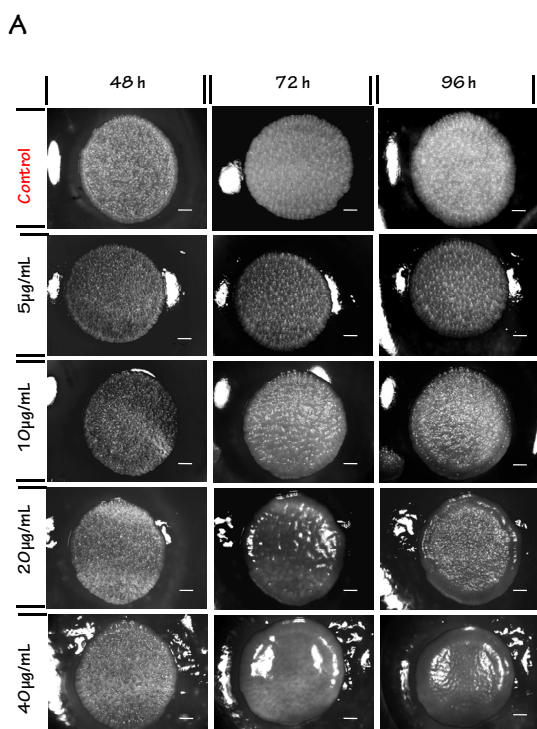


Figura 132. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo concentraciones crecientes (entre 5 y 40 µg·mL⁻¹) de pinoresinol (A) o secoisolariciresinol (B). Las fotografías fueron tomadas a las 48, 72 y 96 h. Las barras de escala indican 1 mm.

El mismo efecto resultó mucho más acusado en presencia de secoisolariciresinol (B), donde el cambio morfológico de la colonia ya fue apreciable a las 48 h de incubación cuando la concentración fue de 10 µg·mL⁻¹.

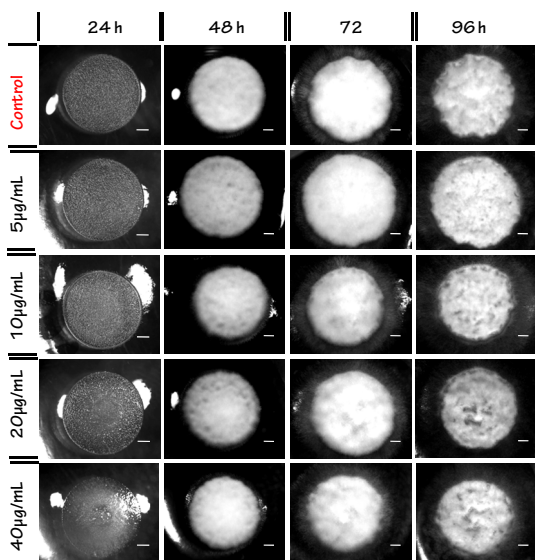
Se realizó un experimento similar pero esta vez utilizando una mezcla de esporidios compatibles (+ y -), a concentración $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹, para valorar el efecto de ambos lignanos sobre su

conjugación. La evolución de la colonia a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 133.

En presencia de pinoresinol (A) la conjugación tuvo lugar, a cualquiera de las concentraciones utilizadas, de manera muy semejante al control. Lo único que se pudo apreciar, antes de la aparición del micelio, fue una ligera modificación morfológica de la colonia, con tendencia al alisamiento, a las 24 h en presencia de pinoresinol $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo, el secoisolariciresinol sí que produjo un efecto sobre la evolución de la conjugación. Ésta se aceleró en presencia del lignano a una concentración $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pudiendo ser visualizada a las 24 h (B).

Figura 133

A



B

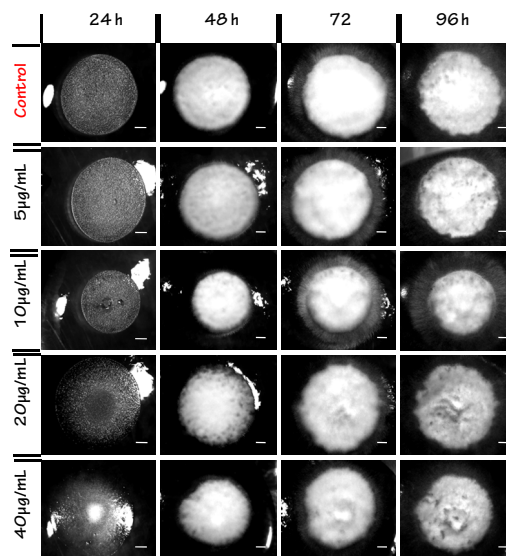


Figura 133. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios compatibles (+ y -) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo concentraciones crecientes (entre 5 y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de pinoresinol (A) o secoisolariciresinol (B). Las fotografías fueron tomadas a las 24, 48, 72 y 96 h. Las barras de escala indican 1 mm.

Una muestra de esporidios fue tomada del borde de las colonias que habían presentado cambios morfológicos tras su incubación con pinoresinol $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y secoisolariciresinol $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con el fin de observar la morfología de éstos durante su crecimiento. El citoplasma y la pared de las células fueron teñidas con azul de lactofenol (Figura 134). De nuevo se observó la existencia de alteraciones morfológicas en las células fúngicas que estaban creciendo en presencia de los lignanos. Estas alteraciones hacían referencia a un mayor

tamaño o una tinción no homogénea del citoplasma. El efecto era mayor en las células que crecían en presencia de pinoresinol.

Figura 134

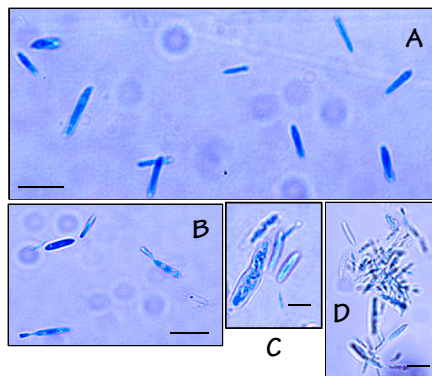


Figura 134. Micrografías obtenidas por microscopía óptica correspondientes a una muestra de esporidios aislados (+) de *S. scitamineum* teñidos con azul de lactofenol, para el marcaje del citoplasma y la quitina de la pared celular. La muestra de esporidios para la tinción fue tomada del borde de una colonia que estaba creciendo en ausencia (A) o en presencia de pinoresinol 40 µg·mL⁻¹ (C y D) o secoisolariciresinol 20 µg·mL⁻¹ (B). Las barras de escala indican 10 µm.

Los experimentos de crecimiento de esporidios aislados (+) y conjugación de esporidios compatibles (+ y -) fueron repetidos en presencia de una concentración de pinoresinol 100 µg·mL⁻¹ y utilizando una dilución 1/1000 (v/v) de la concentración original de esporidios (2,6·10⁶ esporidios·mL⁻¹) para comprobar si el efecto citotóxico del lignano era más definitorio cuando actuaba sobre un menor

número de células patogénicas. Cuando la concentración de esporidios era 1/1000 (v/v) de la original, este crecimiento era en forma de micro-colonias, como resultado de la baja densidad celular. Los resultados son mostrados en las Figuras 135 y 136, donde *a* se refiere a la concentración original de esporidios (2,6·10⁶ esporidios·mL⁻¹) y *a/1000* a la concentración original diluida 1000 veces (2,6·10³ esporidios·mL⁻¹).

Figura 135

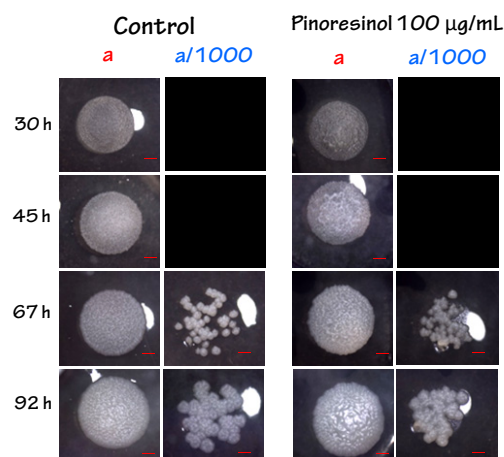


Figura 135. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) en ausencia (control) o en presencia de pinoresinol 100 µg·mL⁻¹. El ensayo fue realizado para una concentración de esporidios de 2,6·10⁶ esporidios·mL⁻¹ y para una dilución 1/1000 (v/v) de esa concentración. Las fotografías fueron tomadas a las 30, 45, 67 y 92 h. Las barras de escala indican 1 mm.

Las altas concentraciones del lignano no impidieron el crecimiento (Figura 135) ni

la conjugación (Figura 136) de la colonia, aunque sí consiguieron retrasar la aparición de ésta cuando se utilizó una concentración de esporidios conjugantes 1/1000 (v/v) en algunas de las réplicas realizadas.

Figura 136

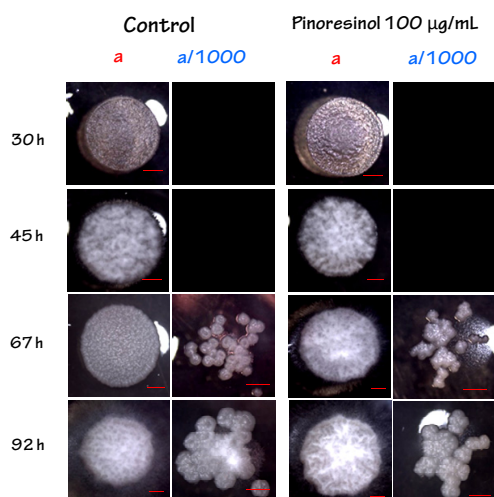


Figura 136. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios conjugantes (+ y -) en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) en ausencia (control) o en presencia de pinoresinol 100 µg/mL. El ensayo fue realizado para una concentración de esporidios de $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹ y para una dilución 1/1000 (v/v) de esa concentración. Las fotografías fueron tomadas a las 30, 45, 67 y 92 h. Las barras de escala indican 1 mm.

Por ejemplo, en el progreso de la colonia de esporidios compatibles a/1000 (v/v) que muestra la Figura 136, la conjugación en presencia de pinoresinol 100 µg·mL⁻¹ a las 92 h aún no podía ser visualizada, dado que no se apreciaba la aparición de micelio. Ni siquiera apareció a las 96 h (Figura 135), sugiriendo que el

lignano había bloqueado el proceso. Sin embargo, esto no ocurrió en todas las réplicas realizadas.

Sí pudieron ser visualizadas alteraciones morfológicas de la colonia en presencia de pinoresinol 100 µg·mL⁻¹ en todas las réplicas realizadas cuando los esporidios eran incubados a una baja concentración de inóculo, tanto en los ensayo de crecimiento (Figura 137) como en los de conjugación (Figura 138).

Figura 137

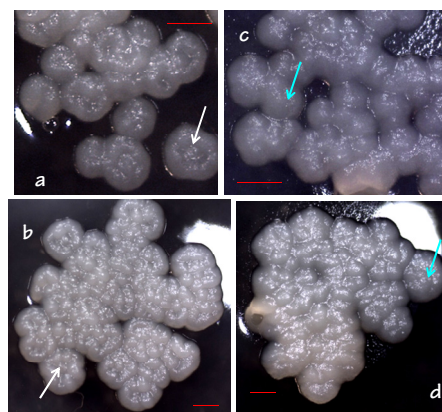


Figura 137. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+), a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^3$ esporidios·mL⁻¹, en secciones de medio PDA al 4,2% (v/v). Se muestra el progreso de una colonia control (a y b, a las 72 y a las 96 h, respectivamente) y de una colonia creciendo en presencia de pinoresinol 100 µg·mL⁻¹ (a las 72 y 96 h, c y d, respectivamente). Las flechas blancas y azules señalan la presencia de la morfología típica de las colonias control e incubadas con pinoresinol, respectivamente. Las barras de escala indican 0,5 mm.

Figura 138

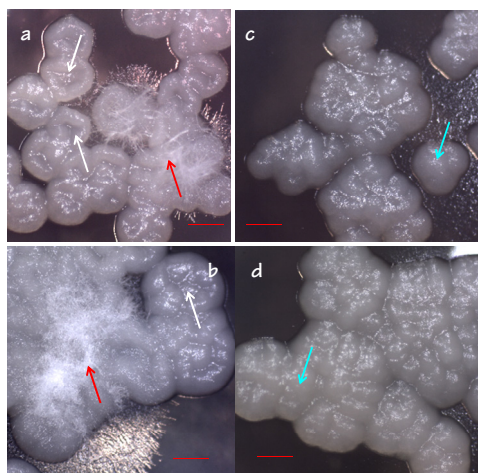


Figura 138. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios compatibles (+ y -), a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^3$ esporidios·mL⁻¹, en secciones de medio PDA al 4,2% (v/v). Se muestra el progreso de una colonia control (a y b, a las 72 y a las 96 h, respectivamente) y de una colonia creciendo en presencia de pinoresinol 100 µg·mL⁻¹ (c y d, a las 72 y 96 h, respectivamente). Las flechas blancas y azules señalan la presencia de la morfología típica de las colonias control e incubadas con pinoresinol, respectivamente. Las barras de escala indican 0,5 mm.

Mientras que las micro-colonias se mostraban definidas y achatadas en el centro en el control, en presencia del lignano perdían el hundimiento central y se difuminaba la separación entre ellas.

8.3.3-Medida de la cantidad de proteínas contenidas en las colonias durante su crecimiento en presencia de pinoresinol y secoisolariciresinol

La Figura 139 muestra la variación en el contenido proteico de las colonias de *S. scitamineum* a lo largo del tiempo, creciendo éstas en presencia de concentraciones crecientes de pinoresinol. La valoración se realizó en colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -), a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹ en ambos casos, para analizar el efecto tanto sobre el crecimiento como sobre la conjugación del patógeno.

La cantidad de proteínas obtenida a partir de la colonia de esporidios aislados en crecimiento aumentó a lo largo del tiempo desde el comienzo hasta alcanzar un máximo a las 72 h de cultivo, para después disminuir a las 96 h (Figura 139 A). Cuando el medio contenía pinoresinol la cantidad de proteína recuperada era menor que en el ensayo control, si bien se observaba un máximo también a las 72 h de incubación. Las diferencias en el contenido de proteínas entre las colonias control y las incubadas con pinoresinol 40 µg·mL⁻¹ llegaron a alcanzar niveles del 80% a las 72 h.

Sin embargo, cuando se analizaron los resultados de los ensayos de conjugación de esporidios compatibles (+ y -) en presencia de concentraciones crecientes del lignano

se observó que éste no ejercía ningún efecto sobre la cantidad de proteínas recuperadas de la colonia durante la conjugación (B).

Figura 139

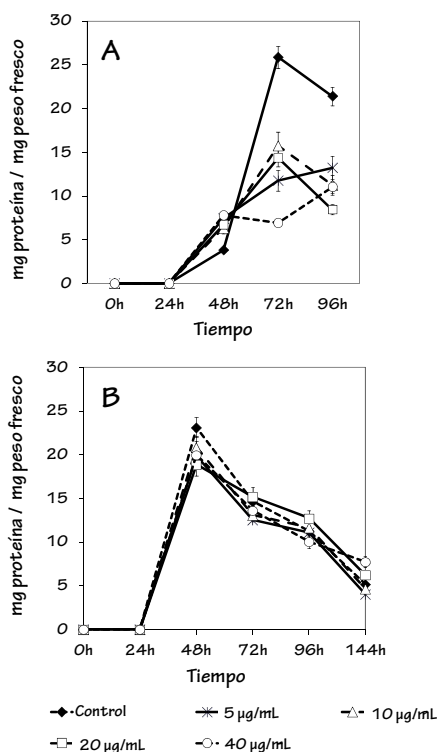


Figura 139. Cantidad de proteínas (mg de proteína · mg de peso fresco⁻¹) producidas durante el crecimiento de una colonia de esporidios no compatibles (+) en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes (entre 5 y 40 µg · mL⁻¹) de pinoresinol (A). Cantidad de proteínas (mg de proteína · mg de peso fresco⁻¹) producidas durante el crecimiento de una colonia de esporidios compatibles (+ y -) en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes (entre 5 y 40 µg · mL⁻¹) de pinoresinol (B). El contenido de proteínas fue valorado a diferentes tiempos de incubación (0-144 h). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

Los niveles de pinoresinol y de secoisolariciresinol en el tejido de caña variaban con las inoculaciones, presentándose como posibles candidatos a ser los agentes biotóxicos capaces de bloquear el crecimiento fúngico. Sin embargo, la falta de resultados concluyentes en relación al efecto del pinoresinol y el secoisolariciresinol llevo a pensar que quizá era necesaria su co-existencia con otros lignanos para lograr un resultado tóxico definitorio sobre el desarrollo del hongo. Por ello, se diseñaron experimentos para evaluar el efecto de una mezcla de lignanos comerciales sobre el desarrollo del patógeno fúngico.

8.3.4-Desarrollo de la colonia en presencia de la mezcla de lignanos comerciales

Se valoró el efecto que concentraciones crecientes (5-40 µg · mL⁻¹) de la mezcla de lignanos comerciales (isolariciresinol, lariciresinol, matairesinol, secoisolariciresinol y pinoresinol) ejercía sobre el crecimiento de una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^6$ células · mL⁻¹ de esporidios aislados (+) o compatibles (+ y -). Los resultados se muestran en la Figura 140.

En ningún caso los lignanos evitaron el crecimiento ni la conjugación de las colonias. Únicamente fue observada ausencia de crecimiento en el borde de algunas de ellas, en las primeras fases de su desarrollo. Las

colonias control se caracterizaban por presentar un borde definido, resultado de una alta densidad celular en la zona más periférica de la colonia. Este borde tendía a

difuminarse o incluso a desaparecer cuando la concentración de la mezcla de lignanos aumentaba.

Figura 140

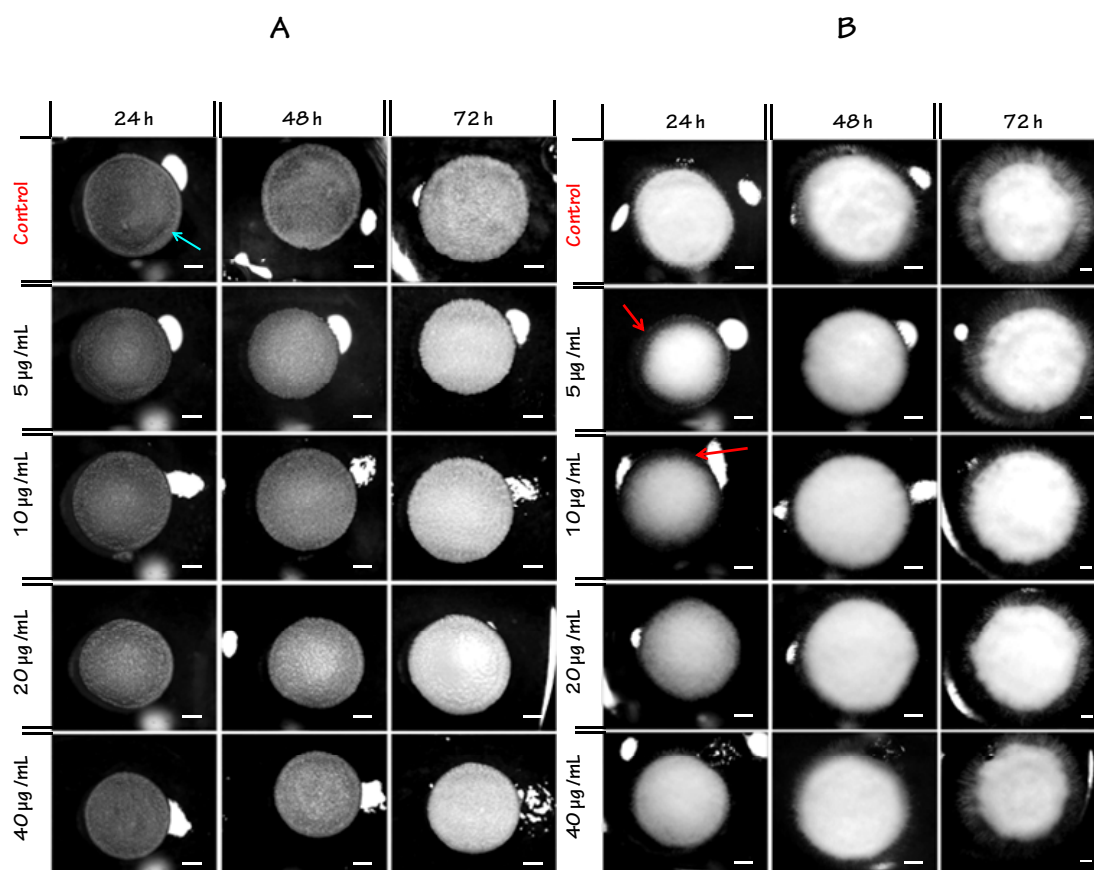


Figura 140. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+), (A), y de esporidios compatibles (+ y -), (B), en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) en ausencia (control) o en presencia de concentraciones crecientes (5-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de una mezcla de lignanos conformada por pinoresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol e isolariciresinol. Las fotografías fueron tomadas a las 24, 48 y 72 h. En A, la flecha azul señala la presencia de un borde definido en la muestra control. En B, la flecha roja señala la ausencia de borde en algunas de las colonias observadas. Las barras de escala indican 1 mm.

8.3.5-Alteración de la organización nuclear en presencia de la mezcla de lignanos comerciales

El marcaje nuclear con DAPI tras la incubación de esporidios aislados (+) en presencia de concentraciones crecientes de la mezcla de lignanos mostró alteración de la organización nuclear en los esporidios tras la incubación (Figura 141). Mientras que los núcleos de los esporidios control (incubados en ausencia de lignanos) se mostraban condensados y localizados en las células, los esporidios, tras el contacto con la mezcla de lignanos, manifestaban una descondensación nuclear evidente y sus núcleos eran difícilmente localizables en un punto concreto del interior celular, como sí ocurría en las células control.

Esto fue observado en presencia simultánea de los cinco lignanos a las concentraciones para la mezcla de 5, 10 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En concreto, la concentración de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ produjo las alteraciones más significativas en las células, las cuales además incrementaron de tamaño en relación al control. Fue interesante comprobar que la concentración más elevada (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) revertió el efecto, mostrando los esporidios una disposición nuclear más semejante al control.

Figura 141

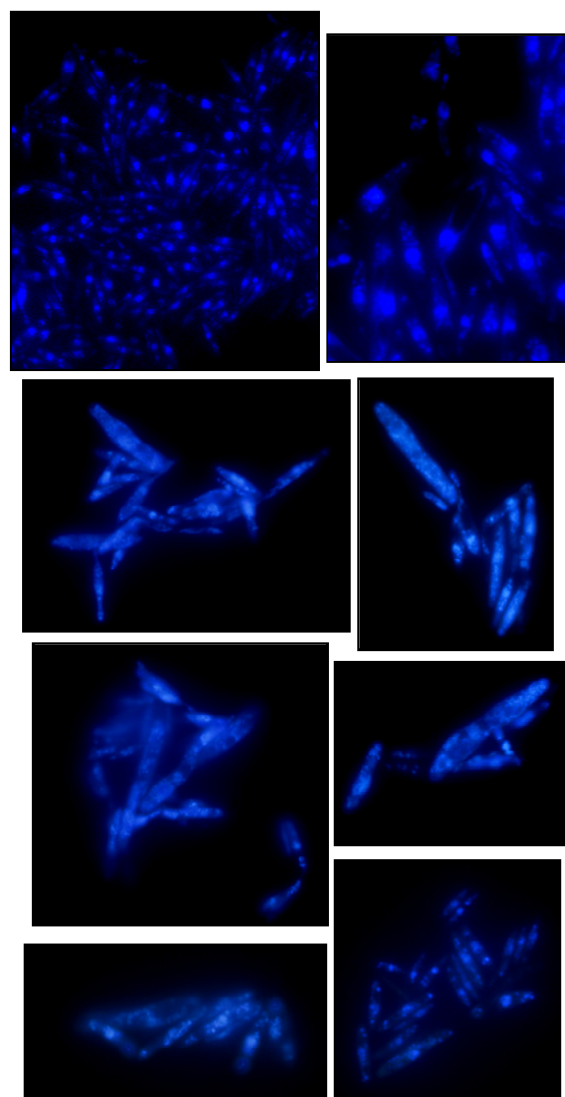


Figura 141. Micrografías obtenidas mediante microscopio de fluorescencia correspondientes a esporidios aislados (+) incubados en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes (5-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de una mezcla de lignanos conformada por pinoresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol e isolariciresinol, y posteriormente teñidos con DAPI. Las flechas verdes señalan la presencia de núcleos condensados en las células y las flechas rojas la presencia de núcleos descondensados o fragmentados por todo el citoplasma celular. Las barras de escala indican 10 μm .

La mezcla de lignanos, al igual que la presencia de secoisolariciresinol y pinoresinol, produjo transformaciones en las células del patógeno, muchas de las cuales presentaban una notable desorganización nuclear en su interior. Sin embargo, no podía concluirse definitivamente que los lignanos ejercieran acción citotóxica, ya que el crecimiento de la colonia (si bien ésta a veces presentaba cambios morfológicos), no quedaba bloqueado en ningún caso.

Por ello se realizaron ensayos para evaluar el nivel de desarrollo del patógeno en presencia de los lignanos que habían sido extraídos directamente a partir del tejido de la planta, sospechando que algún componente contenido en ese extracto podría ser clave para el establecimiento de un efecto perjudicial definitorio sobre la infección.

8.4.-EFECTOS DE LOS EXTRACTOS DE LIGNANOS DE TEJIDO MERISTEMÁTICO DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE EL DESARROLLO DEL PATÓGENO

8.4.1-Desarrollo de las colonias en presencia de un extracto de lignanos de tejido meristemático de caña de azúcar

Los lignanos habían sido extraídos siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4 (*Extracción de lignanos totales a partir de tejido de caña de azúcar*) de Material y

Métodos, a partir de tejido meristemático de plantas de caña de azúcar no inoculadas (control), inoculadas con el patógeno e inyectadas con agua de los dos cvs.

Se valoró el efecto que cada extracto de lignanos ejercía sobre el crecimiento de las colonias una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ de esporidios aislados (+) o compatibles (+ y -). Los resultados se muestran en la Figura 142. Aparentemente no se apreciaron diferencias ni en el crecimiento de esporidios aislados (+), (A), ni en la conjugación de esporidios compatibles, (+ y -), (B), en presencia de ningún extracto.

Con respecto al crecimiento de las colonias, únicamente se podría decir que se apreció un alisamiento superficial de la colonia, entre las 72 y las 96 h tras el comienzo del experimento en alguno de los casos (Figura 142 A). Fue así en presencia de los lignanos obtenidos a partir del tejido de plantas del cv. B 42231 en ausencia (C) y en presencia de inoculación con el patógeno (I), y de plantas del cv. resistente tras su inoculación (I). El desarrollo de la colonia de esporidios aislados (+) en presencia del extracto de lignanos de plantas no inoculadas (C) del cv. My 55-14 se asemejó más al crecimiento de la colonia de esporidios que crecía en ausencia de lignanos en el medio (control).

Figura 142

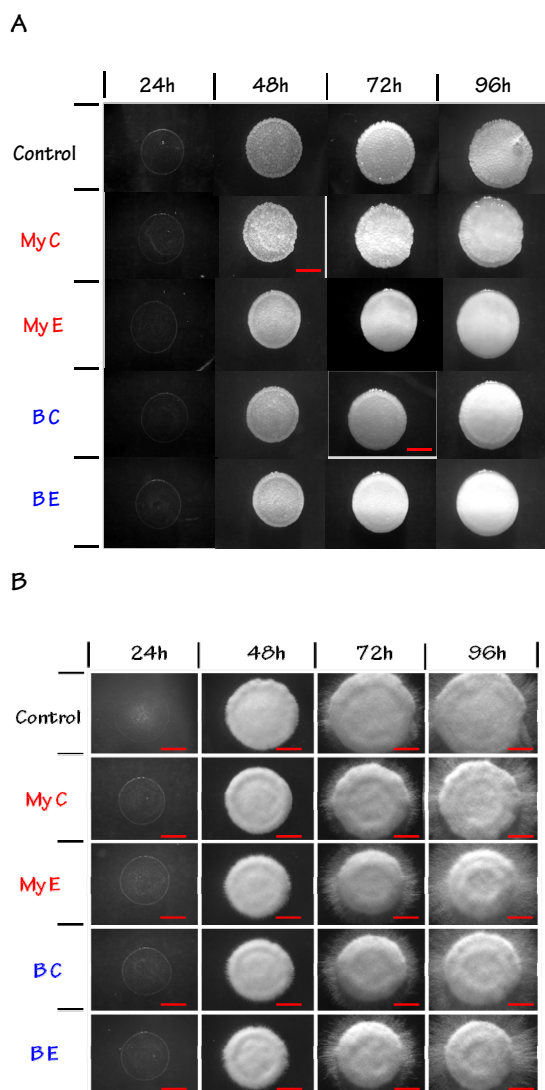


Figura 142. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) y esporidios compatibles (+ y -) (B) incubados en secciones de medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo un extracto de lignanos procedente del tejido meristemático de plantas de caña de azúcar de los cvs. resistente (My 55-14) o susceptible (B 42231), en ausencia del patógeno (C, control) o previamente inoculados (I, inoculado) con el patógeno. Una colonia control creció en ausencia de extracto de lignanos. Las fotografías fueron tomadas a las 24, 48, 72 y 96 h. Las barras de escala indican 2mm.

Se midió también la cantidad de proteínas en las colonias a lo largo del periodo de incubación, para obtener resultados cuantificables de su nivel de desarrollo durante el proceso.

8.4.2-Variación en el contenido proteico de las colonias en presencia de los extractos de lignanos

Así, la Figura 143 muestra la variación en el contenido proteico de las colonias de *S. scitamineum* a lo largo del tiempo, creciendo éstas en presencia de extractos de lignanos obtenidos a partir del tejido meristemático de plantas control o inoculadas con el patógeno de los cvs. My 55-14 y B 42231. La valoración se realizó en colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -), a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^6$ esporidios·mL⁻¹ en ambos casos, para analizar el efecto tanto sobre el crecimiento como sobre la conjugación del patógeno. En cada caso se realizó un control, correspondiente al crecimiento colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -) en ausencia de extracto de lignanos.

De la misma manera que ocurría en presencia de pinoresinol (Figura 139), algunos de los extractos de lignanos produjeron una disminución notable en la cantidad de proteínas extraídas de la colonia durante su crecimiento (Figura 143

A), pero no durante su conjugación (Figura 143 B).

Figura 143

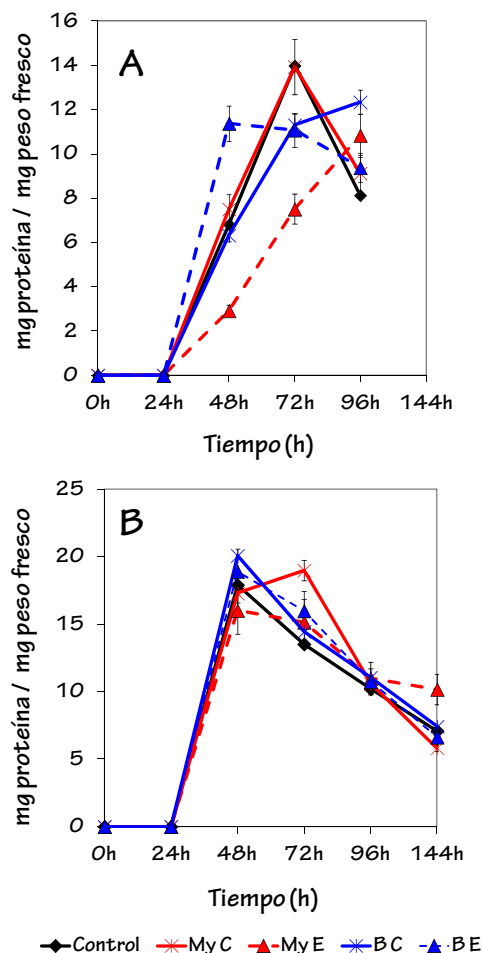


Figura 143. Cantidad de proteínas (mg de proteína·mg de peso fresco⁻¹) producidas durante el crecimiento de una colonia de esporidios aislados (+), (A), o compatibles (+ y -), (B), en ausencia (control) o en presencia de extractos de lignanos obtenidos a partir de tejido meristemático de plantas no inoculadas (C, control) o inoculadas con esporidios compatibles (I, inoculadas) de los cvs. My 55-14 y B 42231. El contenido de proteínas fue valorado a diferentes tiempos de incubación (0-144 h). Las barras verticales indican el error estándar asociado a cada medida.

El mayor efecto fue observado en presencia del extracto de lignanos obtenido a partir de las plantas del cv. resistente inoculadas con esporidios compatibles, My 55-14 (I). A las 72 h, la cantidad de proteínas había disminuido hasta un 50% en relación al control, el cual para ese tiempo de incubación presentaba un pico en la producción de proteínas.

Es interesante, sin embargo, que a las 96 h la cantidad de proteínas extraída de las colonias incubadas en presencia del extracto de plantas inoculadas del cv. My 55-14 siguiera aumentando, sugiriendo que el pico en la producción de proteínas aún no se había manifestado y que únicamente había sido retrasado en presencia del extracto. Algo similar ocurrió tras la incubación con extracto de lignanos de plantas inoculadas del cv. sensible, B 42231 (I), aunque la cantidad de proteínas en términos generales fue mayor y más parecida al control.

La incubación en presencia del extracto de lignanos aislado a partir de plantas no inoculadas del cv. susceptible, B 42231 (C), por el contrario, aceleró la producción de proteínas por parte de la colonia, alcanzando un pico a tiempos más tempranos. Así, a las 48 h la cantidad de proteínas detectada en esta colonia fue aproximadamente un 40% superior a la detectada en el control y hasta un 80% superior a la recuperada de las colonias

incubadas en presencia del extracto de plantas inoculadas del cv. My 55-14. En presencia del extracto de lignanos obtenido de las plantas de la variedad resistente no inoculada, My 55-14 (C), la cantidad de proteínas evolucionó de manera completamente paralela al control.

8.4.3-Desarrollo de las colonias en presencia de extractos de lignanos de caña de azúcar

Tras las diferencias encontradas en relación a la cantidad de proteína recuperada de las colonias incubadas en presencia de los distintos extractos de lignanos, un nuevo ensayo de crecimiento fue realizado en presencia de los mismos extractos, esta vez utilizando una dilución 1/100 (v/v) de una concentración inicial de esporidios aislados (+) correspondiente a $2,6 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹. En el mismo ensayo también se adicionó al medio de incubación un extracto de lignanos obtenido a partir de plantas de ambos cvs. que habían sido previamente inyectadas con agua, My 55-14 (A) y B 42231 (A). Los resultados se muestran en la Figura 144 A.

Para todas las réplicas realizadas, el crecimiento de las colonias fue bloqueado en presencia de los extractos de lignanos obtenidos a partir de plantas control (C) e inoculadas con el patógeno(I) del cv. resistente (Figura 144 A). La incubación en

presencia del extracto de lignanos de My 55-14 (A) redujo el crecimiento de las colonias respecto al de las colonias control, pero sin inhibirlo completamente.

Los diferentes extractos de lignanos obtenidos a partir del cv. sensible (B 42231 (C), B 42231 (A) y B 42231 (I), no evitaron el crecimiento del patógeno.

8.4.4- Germinación de teliosporas en presencia de extracto de caña

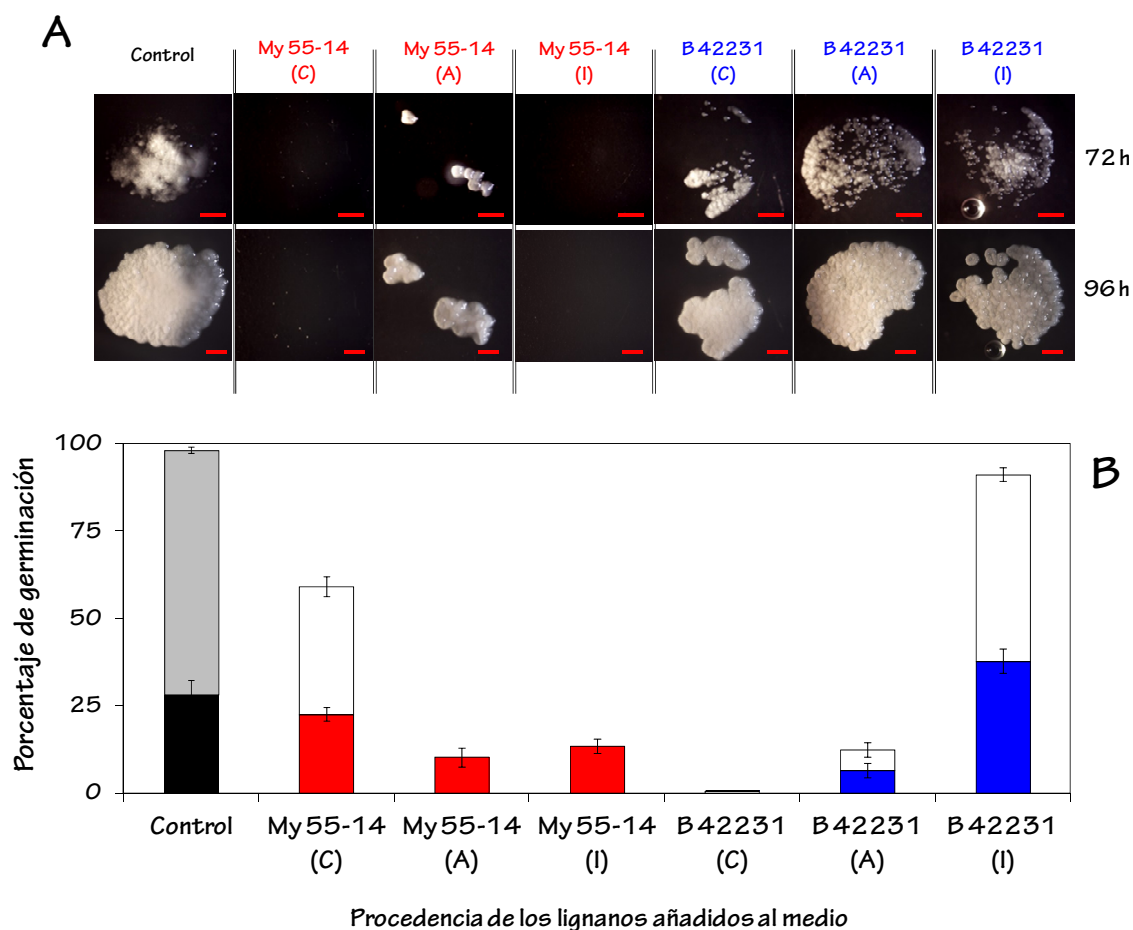
Un ensayo de germinación de teliosporas en agar 0,1% (p/v) fue llevado a cabo en presencia de los mismos extractos de lignanos obtenidos a partir de plantas de caña de azúcar de ambos cvs. que habían sido previamente inyectadas con agua (A) o inoculadas con esporidios (I) respecto a un control sin inocular (C). Los resultados fueron valorados tras 15 h de incubación (Figura 144 B).

Los lignanos extraídos de plantas control del cv. resistente, My 55-14 (C), redujeron el porcentaje de germinación de un 100 a un 40%. Los mismos producidos por el mismo cv. tras la inyección con agua (A) o la inoculación con esporidios (I), indistintamente, los disminuyeron hasta niveles inferiores al 15% y, sorprendentemente, ningún esporidio fue liberado.

También los extractos de lignanos procedentes de plantas control (C) e inyectadas con agua (A) del cv. B 42231 inhibieron la germinación, sobre todo en el primer caso. Sin embargo, aunque el total de porcentaje germinativo disminuyó, no fue consecuencia de un bloqueo en la liberación de los esporidios, que podían ser visualizados en el medio. Las teliosporas germinaron normalmente en presencia del extracto de lignanos de plantas inoculadas del cv. susceptible, B 42231 (I).

Finalmente, para una comparación conjunta, la Figura 144 C representa gráficamente los resultados obtenidos por CZE (correspondientes a la Tabla XI) en relación al contenido de pinoresinol y secoisolariciresinol en los extractos de lignanos obtenidos a partir de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 control o previamente inyectadas con agua o inoculadas con el patógeno.

Figura 144



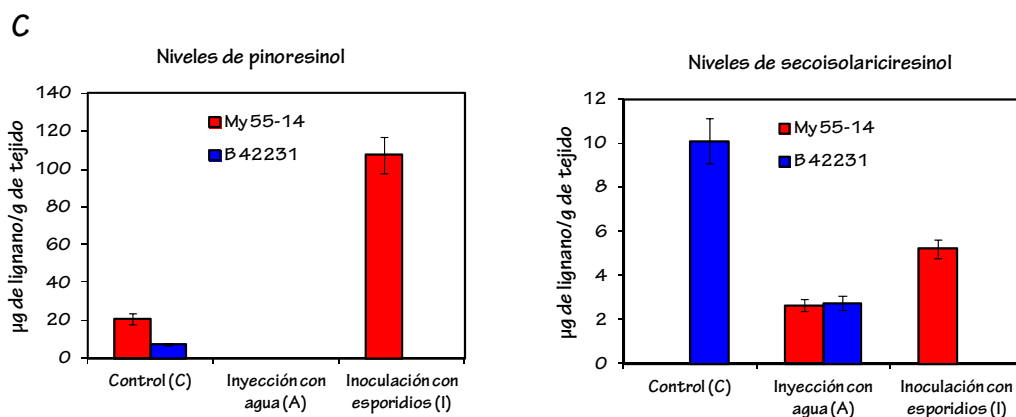


Figura 144. Micrografías obtenidas mediante microscopio estereoscópico correspondientes al crecimiento de colonias de esporidios aislados (+) en medio PDA al 4,2% (p/v) conteniendo extractos de lignanos aislados a partir de tejido meristemático de plantas control (C), inyectadas con agua (A, agua) o inoculadas con el patógeno (I, inoculadas) de los cvs. resistente (My 55-14) o susceptible (B 42231). Las imágenes fueron tomadas a las 72 y 96 h. Las barras de escala indican 1mm (A). Porcentaje de germinación de teliosporas de *S. scitamineum* en ausencia (Control) o en presencia de extractos de lignanos de tejido meristemático de plantas control, inyectadas con agua (A,) o inoculadas con el patógeno (I) de los cvs. resistente o susceptible. En la germinación, se diferencia entre la aparición de tubos germinativos (color intenso) o esporidios libres (color pálido) (B). Niveles de pinoresinol y secoisolariciresinol detectados por CZE (ver Tabla XI) (C). Las barras verticales indican el EE correspondiente a las medias de las valoraciones.

Discusión

1-LA CITOAGLUTINACIÓN, EL INICIO DE LA RESISTENCIA

Los experimentos de quimioatracción realizados en presencia de las glicoproteínas contenidas en el jugo de caña de azúcar demostraron que las teliosporas se mueven activamente hacia el agente quimiotáctico (Figura 36). La respuesta fue máxima a las 5 h de contacto con las glicoproteínas MMMG y HMMG producidas por los cvs. My 55-14 y B 42231 (Figura 34), a pesar de que el resultado se potenció en presencia de la fracción glicoproteica de alto peso molecular (HMMG) del cv. resistente.

El efecto quimioatractante, ejercido simultáneamente sobre un gran número de teliosporas, condujo irremediablemente a la aglutinación de las células en el punto de máxima concentración de glicoproteínas (Figuras 35 y 37). La agregación dependiente de quimiotaxis ha sido también observada en células de *Dictyostelium*, demostrándose que los mutantes incapaces de seguir el gradiente quimiotáctico no forman agregados (Wang *et al.*, 2011).

Ha sido descrito cómo la citoaglutinación reduce la capacidad invasiva del patógeno por medio de la inhibición de la germinación (Fontaniella *et al.*, 2002; Millanes *et al.*, 2005). Por ello, ya

que la citoaglutinación de las células fúngicas evita la infección, se propone que el efecto quimiotáctico de las glicoproteínas de caña, como desencadenante del proceso, debe desempeñar un papel defensivo importante durante la interacción planta-patógeno. De esta manera, las HMMG del cv. resistente, al ejercer un mayor poder quimioatractante sobre las teliosporas, estimularían la aglutinación de un mayor número de células. Esto, unido a la estimulación quimiotáctica temprana observada a las 3 h (Figura 34), podría ser fundamental para el establecimiento de una respuesta de defensa eficaz y determinante para el bloqueo de la infección.

Sin embargo, sorprendió que el efecto quimiotáctico ejercido por las distintas glicoproteínas desapareciese a las 6 h de incubación, dando como resultado el retorno de las células al medio desde los capilares (Figura 34) y en la disgregación de las grandes aglutinaciones que se habían formado a las 5 h (Figura 38). Por ello, se analizó la interacción entre las glicoproteínas y las teliosporas del carbón a lo largo del tiempo, utilizando glicoproteínas HMMG marcadas con FITC (Figura 39). El mínimo valor de fluorescencia encontrado en el medio fue observado a las 5 h tras el contacto con las células fúngicas, momento en el cual una mayor cantidad de HMMG debía encontrarse unida a su ligando de pared en las teliosporas. Sin embargo, a las

6 h las glicoproteínas retornaron al medio de incubación y con ello aumentó nuevamente la fluorescencia de ese medio. La desaparición de la interacción entre las HMMG y las teliosporas explica que lo hicieran también los efectos quimiotáctico y citoaglutinante.

Se investigó entonces la existencia de actividades degradativas contenidas en las HMMG que pudieran estar relacionadas con la pérdida de capacidad interactiva entre las glicoproteínas y las células fúngicas y con la aparición de protoplastos en el medio tras las diferentes incubaciones (Figura 39). Se observó que la fracción HMMG de las glicoproteínas producidas por plantas del cv. My 55-14 contiene actividades quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4 glucanasa y que incluso las dos primeras enzimas incrementan su actividad tras el contacto con las teliosporas (Figura 40). Se propuso que la presencia de actividades degradativas en las glicoproteínas estaría relacionada directamente con la pérdida de interacción entre las glicoproteínas y las teliosporas y con la aparición de protoplastos y paredes celulares "vacías" como resultado de la destrucción de las células.

La pared fúngica está formada típicamente por quitina, 1,3- β y 1,6- β glucanos, mananos y proteínas, a pesar de que la composición varía mucho entre

diferentes especies de hongos (Adams, 2004). Así, la quitina es un componente esencial de la pared de los hongos filamentosos (Langner y Göhre, 2016) que no se encuentra formando parte de las paredes celulares de las plantas. La expresión de quitinasa, previamente descrita entre las glicoproteínas de caña de azúcar (Millanes *et al.*, 2005), se induce comúnmente en plantas tras la infección por bacterias, virus u hongos fitopatógenos (Metraux y Boller, 1986; Guan *et al.*, 2008). De igual manera, las β -glucanasas participan en plantas en diversos procesos, como son la germinación, el crecimiento o la defensa contra patógenos, siendo su actividad regulada por numerosas hormonas, elicitores- bióticos o abióticos- y diferentes formas de estrés (Simmons, 1994).

El aumento de la actividad de las enzimas quitinasa y β -1,3-glucanasa observado en las glicoproteínas de caña tras la incubación en presencia de las teliosporas ha sido también descrito en plantas de *Eruca sativa* ante la infección por *Alternaria brassicicola* (Gupta *et al.*, 2013). Estos autores relacionan directamente la producción incrementada de estas enzimas con un mecanismo de defensa derivado de la destrucción de la pared de las células fúngicas. Este ataque, además de reducir al patógeno, favorece la liberación de pequeñas señales de reconocimiento a partir de los

componentes de pared, elicitando una señal de defensa más específica por parte de la planta. De igual manera, se ha comprobado que los extractos proteicos obtenidos a partir de vainas de guisantes infectadas con *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* contienen altos niveles de actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa, las cuales actúan sinérgicamente degradando la pared celular del patógeno (Mauch *et al.*, 1988). Jongedijk *et al.* (1995) demostraron que la expresión simultánea de los genes que codifican para quitinasa y β -1,3-glucanasa incrementan la resistencia de las plantas de tomate al patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. También ha sido descrita la existencia de actividad β -1,3-glucanasa durante la interacción entre la caña de azúcar y las teliosporas del carbón (Su *et al.*, 2013). Los mismos autores indicaron que la actividad degradativa de la enzima aumenta más rápidamente y se mantiene durante más tiempo tras la inoculación con el patógeno en plantas de variedades resistentes.

De esta manera, las enzimas degradativas, contenidas en las glicoproteínas HMMG de caña de azúcar y cuya actividad se estimula tras el contacto con las teliosporas, participarían en la estrategia defensiva de la planta desencadenada por la quimioatracción, destruyendo la pared de las células

fúngicas aglutinadas y evitando el progreso de la infección.

Identificación del agente citoaglutinante y quimioatractante en las glicoproteínas

Fontaniella *et al.*, (2002) describieron cómo la citoaglutinación de las teliosporas reduce la capacidad invasiva del patógeno y Millanes *et al.* (2005) propusieron que la arginasa contenida en las glicoproteínas HMMG (SCA) podría ser la responsable de la inhibición de la germinación fúngica por medio de su unión a la pared de las teliosporas. Se partió de este punto para sospechar que la SCA podría ser el agente citoaglutinante de las HMMG.

Los ensayos de quimioatracción y citoaglutinación en presencia de las enzimas que se sabían contenidas en las HMMG (SCA, β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa y quitinasa) no identificaron a ninguna de ellas como el agente quimioatractante de las HMMG (Figura 43) pero sí revelaron diferencias significativas en relación a los agregados formados en presencia de los diferentes agentes (Figuras 44 y 45). Así, una estimulación de la aglutinación fue evidenciada en presencia del total de HMMG y la arginasa semi-purificada (SCA) de plantas no inoculadas del cv. resistente. Por el contrario, las enzimas degradativas no potenciaron la agregación, demostrándose que la SCA contenida en las glicoproteínas

era el agente responsable de la citoaglutinación de las teliosporas fúngicas.

La separación electroforética por PAGE-SDS (Figura 42) de la fracción de SCA que contenía mayor actividad arginasa (Figura 41) reveló la existencia de dos bandas, de aproximadamente 85 y 100 kDa que podrían identificarse con dos isoformas de la misma enzima, si ésta fuera una proteína monomérica. Sin embargo, comúnmente, la arginasa se presenta formando oligómeros (Jenkinson *et al.*, 1996), por lo que las bandas podrían corresponder a cada una de las subunidades que presenta la proteína cuando se encuentra en su conformación nativa. Se sugiere así que el agente citoaglutinante contenido en las HMMG es una proteína arginasa oligomérica con un número no definido de subunidades n (85 kDa-100 kDa).

Según la definición acuñada por Goldstein *et al.*, en 1980, las lectinas son proteínas o glicoproteínas, que no tienen origen inmunológico, y que se unen a azúcares, aglutinando células y/o precipitando glicoconjugados. Posteriormente, Franz *et al.*, en 1982, concretaron que las lectinas son siempre glicoproteínas.

Las lectinas en vegetales pueden tener propiedades defensivas contra especies patógenas. Por ejemplo, lectinas

producidas por plantas como *Triticum vulgare*, *Phaseolus lunatus*, *Dolichos biflorus* o por coleoptilos de maíz, producen inhibición de la germinación y el crecimiento de las teliosporas de *U. maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Se sospechó entonces que las glicoproteínas de caña también podrían ser consideradas lectinas, si ejercían su efecto defensivo sobre las teliosporas por medio de su unión a un ligando glicosídico en la pared de las células fúngicas. Para ello y en primer lugar, se confirmó la presencia de ligandos de pared para lectinas vegetales en las células de *S. scitamineum* con sencillos experimentos en presencia de ConA.

La ConA es una lectina producida por *Canavalia ensiformis*, que requiere Ca^{2+} para producir citoaglutinación (Becker *et al.*, 1975) y es capaz de desarrollar actividad arginasa en presencia de Mn^{2+} (Fontaniella *et al.*, 2004). Esta glicoproteína redujo la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum*, indujo su citoaglutinación, estimuló la división de los esporidios formados por gemación y provocó algunas alteraciones celulares, como el alargamiento de las hifas o el ensanchamiento de la sección apical de las mismas (Figuras 54 y 55). Esto confirmó la presencia de ligandos glicosídicos (manósidos) en la pared de las teliosporas capaces de reconocer la lectina producida por *C. ensiformis*.

Los experimentos de desorción de la ConA en presencia de metil-manosa (Figura 56) demostraron la afinidad de la lectina por el azúcar al producir éste su desligamiento de la pared de las teliosporas, de la misma manera que describe la bibliografía (Naismith y Field, 1996). Resultó interesante que las glicoproteínas de caña de azúcar también produjeran desorción de la lectina retenida, aunque ésta fue mucho menor que la producida en presencia del azúcar. Esto sugirió que alguna lectina contenida en las glicoproteínas podría estar compitiendo por su unión al mismo dominio glicosídico que la Con A.

La mitad glicídica de las glicoproteínas defensivas de caña han sido descritas como heterofructanos compuestos por largas cadenas de β -1,2-fructofuranósidos (F) en las cuales se intercalan unidades o pequeños oligómeros de galactitol (G), siendo de esta manera definidas las glicoproteínas HMMC definidas como $[G_3:F_2]_n$ y las MMMG como $[G_5:F_3]_n$ (Legaz *et al.*, 1990). Debido a que la SCA es desorbida por sacarosa cuando se encuentra unida a su ligando de pared en las teliosporas (Millanes *et al.*, 2005), es probable que la enzima se una a la región peptídica del ligando de pared por su dominio fructofuranósido, aunque también podría unirse mediante un dominio peptídico que reconociese D-galactosa, azúcar

presente en la pared de los hongos *Ustilaginomycetes* (Wang *et al.*, 2014). Éste podría ser el mismo dominio que utiliza la SCA para su unión a la ureasa glicosilada durante el proceso de semi-purificación de la enzima (Legaz *et al.*, 2004) y que presentan las lectinas de otros muchos organismos (Lyimo *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2011). Así, solo en el caso de que la SCA se uniera a D-galactosa, la arginasa podría ser considerada estrictamente como lectina. Sin embargo, en ningún caso podría ser la responsable del desplazamiento de la Con A cuando ésta se encontraba unida a manosa sobre la superficie celular.

Por otro lado, también cabría la posibilidad de que la proteína quimioattractante contenida en las glicoproteínas fuera una lectina si ejerciera su acción por medio de la unión a dominios glicídicos presentes en la pared de las teliosporas. La existencia de desorción, aunque mínima, en presencia de glicoproteínas HMMG podría significar que la Con A y la posible lectina contenida en las HMMG compitieran por su unión a residuos de manosa de la superficie celular.

Se ha descrito la existencia en plantas de lectinas relacionadas con jacalina, una proteína aislada de *Artocarpus integrifolia*, de unión específica a residuos de manosa o galactosa y que participan en la defensa vegetal (Lannoo y Van Damme,

2014). Estas proteínas tienen efecto citoaglutinante (Ma *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2006) e incluso se han demostrado sus propiedades quimioattractantes en *Artocarpus incisa* (Oliveira *et al.*, 2014).

En algunas especies de gramíneas las proteínas relacionadas con jacalinas contienen un dominio dirigente N-terminal (también llamado dominio de respuesta a la enfermedad) y un dominio jacalina C-terminal. Así, lectinas relacionadas con jacalina que se unen específicamente a residuos de manosa y que presentan un dominio jacalina y un dominio dirigente han sido descritas en organismos como *Oryza sativa* (Jiang *et al.*, 2006), *Hordeum vulgare* (Grunwald *et al.*, 2007) o *Triticum aestivum* (Ma *et al.*, 2013). La expresión de proteínas relacionadas con jacalina ha sido demostrada también en caña de azúcar en respuesta al estrés (McCormick *et al.*, 2008). Podría entonces pensarse si la unión de la ConA a las teliosporas del carbón no sería una simulación artificial de la existencia de una proteína relacionada con jacalina en caña de azúcar.

Algunas de las bandas obtenidas tras la separación electroforética de las proteínas HMMG y MMMG producidas por plantas no inoculadas de caña de azúcar fueron reveladas como posibles proteínas dirigentes (Figura 120 y Tabla X). La existencia de estos dominios dirigentes en

las glicoproteínas HMMG sugieren que la proteína quimioattractante contenida en las glicoproteínas de caña de azúcar, aún no caracterizada, podría tratarse de una lectina relacionada con jacalina que, al unirse específicamente a residuos de manosa, indujera la desorción de parte de la Con A retenida en la superficie de las teliosporas. Sin embargo, un análisis profundo acerca de la estructura y función de la proteína quimioattractante sería necesario para contrastar esta hipótesis, altamente preliminar.

La SCA es responsable de la inhibición de la germinación de las teliosporas

Se consideró que si la citoaglutinación de las teliosporas conlleva irremediablemente la inhibición de su germinación (Fontaniella *et al.*, 2002; Millanes *et al.*, 2005) y si la SCA es el agente responsable de esa citoaglutinación, entonces la enzima debe desempeñar un papel principal en el bloqueo de la germinación de las células fúngicas.

Los experimentos de germinación en presencia de HMMG y SCA procedentes de plantas no inoculadas del cv. resistente (Figuras 46 y 47) mostraron que ambos tipos de proteínas inhiben la germinación de las teliosporas, por lo que la SCA semi-purificada se confirmaría como la responsable de este proceso.

Hipótesis del mecanismo desencadenado por la quimioatracción de las HMMG

A partir de los resultados obtenidos se propone que al menos tres glicoproteínas existen contenidas en el total HMMG del cv. My 55-14: a) una proteína quimioattractante, no caracterizada, b) una arginasa citoaglutinante que inhibe la germinación de las teliosporas y c) al menos tres enzimas con actividad degradativa, β -1,3 y β -1,4-glucanasas y quitinasa. Esto se ve apoyado por los resultados recogidos previamente por (Legaz *et al.*, 1998b), quienes revelaron por electroforesis capilar

la existencia de 5-6 proteínas diferentes contenidas en la fracción glicoproteica HMMG.

En la Figura 145 se esquematiza un posible mecanismo de resistencia temprano derivado de la producción de glicoproteínas de defensa en las plantas del cv. resistente. En primer lugar, las glicoproteínas estimulan la quimioatracción y la aglutinación de las células patogénicas, las cuales forman grandes agregados a las 5 h tras el contacto con las glicoproteínas. Las teliosporas, aglutinadas por la presencia de SCA son incapaces de germinar.

Figura 145

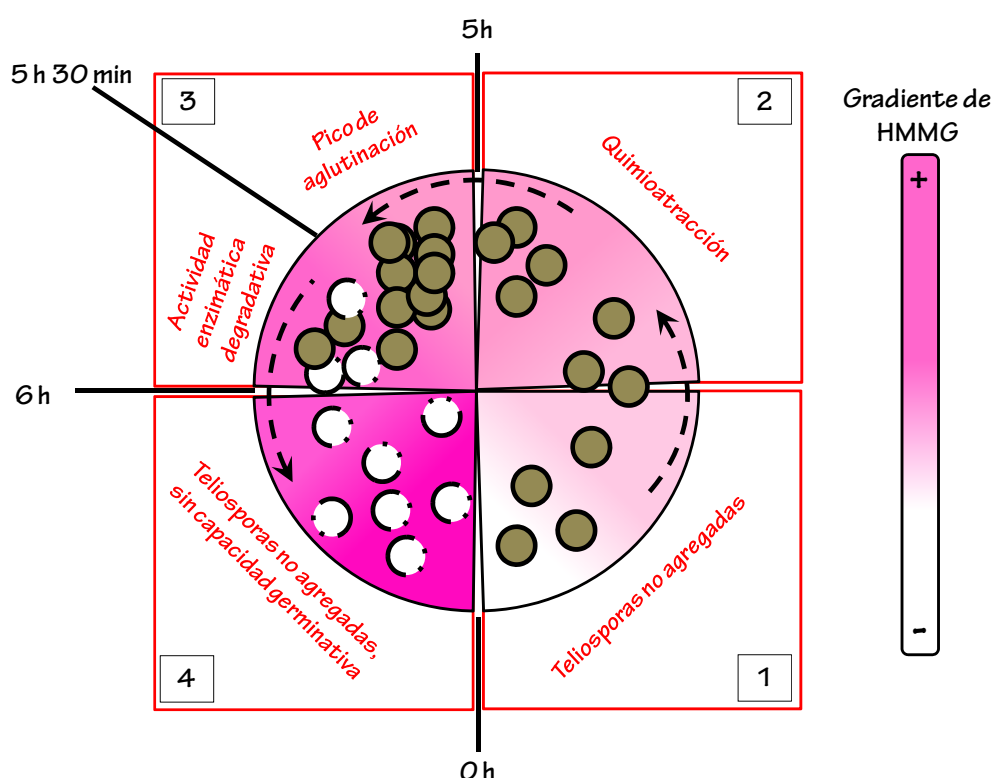


Figura 145. Esquema de la secuencia temporal de eventos (indicados como 1-4) desencadenados por la quimioatracción inducida por el gradiente de glicoproteínas HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. resistente.

Transcurridas las 5 h, estos grandes agregados son reducidos por acción de las enzimas degradativas contenidas en las glicoproteínas HMMG, las cuales pueden actuar simultáneamente sobre un gran número de teliosporas, al encontrarse éstas aglutinadas. Las células entonces se disocian de los agregados debido a la destrucción de sus paredes celulares, y aparecen como "fantasmas" o paredes vacías de protoplastos en el medio. Ésta es también la causa de la desaparición del efecto quimiotáctico a las 6 h tras el contacto con las glicoproteínas representado por el retorno de las células al medio desde el capilar tras los experimentos de quimiotaxis (Figura 34).

Y, ¿en el cv. susceptible?

Se observó que este mecanismo de resistencia no es desencadenado por las glicoproteínas producidas por el cv. susceptible. En primer lugar, las glicoproteínas producidas por B 42231 inducen una menor quimioatracción de las teliosporas en los estadios iniciales (Figura 34). Por otro lado, la comparación del carácter citoaglutinante de las HMMG y las SCAs de plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231 demostró que las plantas susceptibles no son capaces desencadenar una respuesta citoaglutinante eficaz (Figura 52). Las glicoproteínas del cv. sensible incluso

mostraron propiedades anti-aglutinantes sobre las teliosporas, por lo que cabe pensar entonces que la SCA del cv. B 42231, al no ser capaz de estimular la agregación de las células fúngicas, no pueda tampoco evitar la germinación de las teliosporas en las primeras etapas de la infección (Figura 46). Esta última se vio incluso estimulada en presencia de las glicoproteínas procedentes de plantas inoculadas de B 42231.

La presencia de bajas concentraciones de HMMG y SCA procedentes del cv. susceptible inhibió la germinación de las teliosporas, de la misma manera que ocurría para el cv. resistente. Sorprendió, sin embargo, el hecho de que al incrementarse la concentración de la proteína en el medio, el efecto inhibitorio fuera disminuyendo, hasta casi revertirse cuando la concentración de SCA era $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 47). Esto no fue observado en presencia de HMMG y SCA del cv. My 55-14, las cuales inhibieron la germinación de las teliosporas, siendo este efecto agudizado al aumentar la concentración de proteína en el medio (Figura 47). Es posible que en el caso del cv. susceptible la unión de la SCA, contenida en las HMMG, a su ligando de pared sea mucho más débil, de manera que exista una competencia entre las moléculas cuando éstas se encuentran a una alta concentración, tal y como representa la Figura 146. Como resultado, un menor número de moléculas se uniría a la pared de

las teliosporas y explicaría por qué las altas concentraciones de SCA de B 42231 revierten el efecto inhibitorio sobre la germinación (Figuras 46 y 47) y evitan la citoaglutinación (Figura 52).

Figura 146

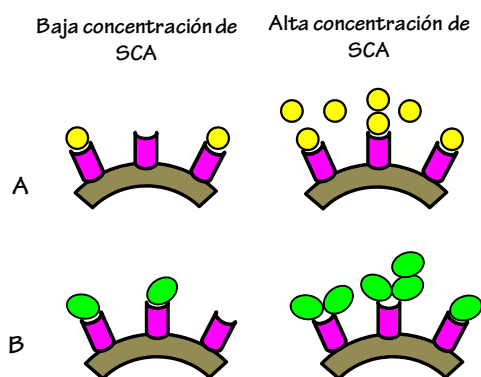


Figura 146. Esquema que representa la unión de las SCAs de los cvs. My 55-14 (A) y B 42231 (B) a su ligando en la pared de las teliosporas. En presencia de una baja concentración de la enzima, ambas proteínas se unen a la superficie celular, lo que conlleva la inhibición de la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* (ver Figura 47). Con una alta concentración de SCA de My 55-14, la cual se une fuertemente a su ligando de pared, se intensifica el efecto negativo sobre la germinación al producirse un mayor número de uniones eficaces ligando-proteína. En presencia de una alta concentración de SCA de B 4223 se revierte el efecto negativo de la enzima sobre la germinación debido a la competencia entre las moléculas, que se unen débilmente a su ligando de pared y se desplazan las unas a las otras fácilmente. Representando (●) las teliosporas del carbón, (■) el ligando de pared para la arginasa, (●) la SCA de My 55-14 y (●) la SCA de B 42231.

Se sospechó entonces que las diferencias encontradas podrían relacionarse con variaciones en la actividad de la SCA entre uno y otro cv.

Diferencias en el contenido y la actividad de la SCA entre cvs.

Se comparó la cantidad de SCA y la actividad de la misma, contenida en las glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas e inoculadas de ambos cvs. (Figuras 48 y 51).

Las plantas no inoculadas del cv. resistente presentan unos niveles de SCA activa mucho más altos en relación a las plantas no inoculadas del cv. susceptible (Figura 51). Por el contrario, las plantas de B 42231 producen bajos niveles de SCA activa. Las uniones débiles propuestas para la SCA de B 42231 a su ligando de pared (Figura 146) podrían deberse justamente a que la enzima se presenta constitutivamente en su conformación inactiva. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia constitutiva de actividad arginasa podría ser clave para mantener a la planta preparada para una infección, al estar esta proteína relacionada con mecanismos de defensa tempranos que confieren resistencia, como son la citoaglutinación y la inhibición de la germinación de las teliosporas. Las plantas del cv. susceptible incrementan la actividad

arginasa en el jugo tras la infección del patógeno cuando, probablemente, ya sea tarde.

Resultó interesante constatar que la actividad enzimática en las plantas del cv. resistente desaparece tras la inoculación, sugiriendo que la actividad arginasa podría no detectarse en el jugo porque se perdió en las plantas, quedando retenida en la superficie de los esporidios. Sin embargo, la ausencia de actividad arginasa en las glicoproteínas de plantas inoculadas del cv. My 55-14 podría indicar que la actividad arginasa cuando la infección ya se ha producido resulta inútil y ésta podría ser inactivada por algún componente también presente en las glicoproteínas. De esta manera, la desaparición de la actividad arginasa contenida en las HMMG tras la inoculación podría ser consecuencia de una modificación en el patrón defensivo por parte de las plantas del cv. resistente.

Comunmente, los sistemas de señalización desencadenada por el ácido salicílico (SA) activa la resistencia contra patógenos biotrofos y hemibiotrofos, mientras que la combinación de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) activa la resistencia contra patógenos necrotrofos (Glazebrook, 2005). Ambas vías de señalización se desencadenan habitualmente de forma antagónica (Thaler *et al.*, 2002). Por ejemplo, la elevada

resistencia de las plantas al ataque por organismos biotrofos se correlaciona normalmente con una susceptibilidad incrementada a necrotrofos, y viceversa (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

La señalización por JA ha sido relacionada con un incremento en los niveles de actividad arginasa (Brauc *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2004), mientras que la acumulación de especies reactivas de oxígeno, ROS (*Reactive Oxygen Species*) actúa sinérgicamente con la señalización por SA, amplificando su respuesta (Draper, 1997; Torres, 2010). Por esta razón, una señalización desencadenada por SA (la cual es a su vez estimulada por ROS) podría desencadenarse en las plantas de My 55-14 tras la inoculación, conllevando la disminución de los niveles de actividad arginasa observada, como resultado de la inhibición de la señalización por JA. Por el contrario, el incremento de actividad arginasa detectado en las plantas del cv. resistente podría reflejar la activación de una defensa basada en la señalización por JA, la cual es fuertemente desencadenada por la formación de heridas (Chen *et al.*, 2004), pudiendo no ser lo suficientemente específica como para defender a las plantas susceptibles del ataque del patógeno.

Fontaniella *et al.* (2002) demostraron que el SA es secretado por teliosporas durante su germinación,

actuando como un elicitador que estimula la producción de glicoproteínas, lo cual no ocurre para el metil-JA. Al mismo tiempo, los mismos autores comprobaron que la adición de las glicoproteínas al medio de cultivo disminuye la cantidad de SA segregado por las teliosporas, indicando que esta molécula podría ser relevante durante la interacción planta-patógeno.

Se ha descrito una fuerte interacción entre la arginasa y la vía de señalización por óxido nítrico, NO, en plantas. Esta interacción radica en que la arginasa compite con la enzima NO sintasa, NOS, por su sitio de unión a la L-arginina. Al compartir el mismo sustrato, la presencia de arginasa atenúa la señalización desencadenada por NO durante la patogénesis en plantas (Chen *et al.*, 2004), tal y como esquematiza la Figura 147.

NO y SA participan sinérgicamente en el establecimiento de mecanismos de defensa contra patógenos en plantas (Klessig *et al.*, 2000): NO, al igual que otras ROS, estimulan la producción de SA, de la misma manera que SA potencia la producción de ROS (Draper, 1997; Torres, 2010). Cabría pensar entonces que los niveles de poliaminas (PAs) desaparecerían cuando estuviera activa la señalización por NO. Sin embargo, se ha descrito en plantas la acumulación de PAs en presencia de SA, el cual media la activación de la enzima ADC

(Zhang *et al.*, 2011). De esta manera, podrían sintetizarse PAs en ausencia de actividad arginasa, como indica la Figura 147.

En este trabajo se propone que la desaparición de la actividad arginasa tras la inoculación en plantas de My 55-14 debe estar relacionada con una mayor producción de NO en las plantas infectadas, como resultado de una mayor actividad de la NOS sobre la L-arginina libre. De esta manera, el incremento de NO estimularía la producción de una defensa específica contra el patógeno fúngico dirigida por el SA. Evidentemente, para confirmar este hecho habría que valorar la producción de NO y SA antes y después de la inoculación en ambos cvs. De momento esta hipótesis resulta puramente especulativa.

Figura 147

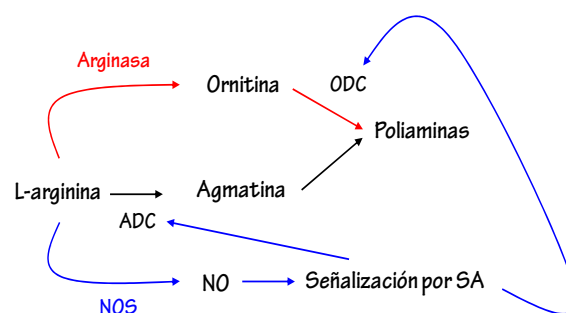


Figura 147. Esquema modificado de Zhang *et al.* (2011) que representa la producción de NO y PAs.

2-¿POR QUÉ QUIMIOTROPISMO Y CITOAGLUTINACIÓN COMO MECANISMO DE RESISTENCIA? SIMULACIÓN DE LA SEÑAL DE *QUORUM SENSING*

La citoaglutinación de las células de *S. scitamineum* podía ser observada también durante la germinación de las teliosporas en ausencia de HMMG, si bien en este caso era menor que la observada en presencia de las glicoproteínas. Por ello, el siguiente propósito fue analizar las características de las proteínas liberadas por las teliosporas en las primeras horas de su germinación, comprobándose que tenían una composición muy similar a las HMMG.

Establecimiento de una señal de quórum en la población fúngica

En primer lugar se demostró la existencia de actividad quimioattractante en las proteínas fúngicas (FP). Las teliosporas se desplazaron activamente hacia los capilares conteniendo las proteínas segregadas durante su germinación (Figura 60). Las FP también manifestaron capacidad aglutinante sobre las células fúngicas (Figura 62). De nuevo la responsable de esta citoaglutinación fue la arginasa del hongo contenida en los segregados e, igual que ocurría en el caso de las HMMG, ésta a su vez no era la responsable de la quimioatracción

La actividad arginasa se produce desde etapas muy tempranas de germinación de las teliosporas (Figura 57). Durante la separación electroforética en PAGE-SDS (Figura 59) se reveló la presencia de dos bandas de migración electroforética idéntica a las dos bandas encontradas tras la separación de la arginasa semi-purificada de caña (Figura 42). Así, se consideró que la arginasa fúngica también podría tener una estructura *n*-(85 kDa-100 kDa).

La detección de actividad arginasa concuerda con lo descrito por Que *et al.* (2014b). Estos autores presentan la secuencia completa del genoma de *S. scitamineum*, la cual incluye 6636 genes diferentes. Se describe que uno de ellos codifica para una proteína que utiliza la arginina como fuente de nitrógeno para el desarrollo fúngico (la arginasa descrita aquí) y otro con la producción de, al menos, una proteína de unión a carbohidratos, descrita también por Taniguti *et al.* (2015) de la familia de las proteínas CAZymes, que se correspondería con el sitio de unión a la arginasa, descrito primeramente por Millanes *et al.* (2008).

La capacidad quimioattractante-citoaglutinante de las FP ha sido considerada como una señal de quórum o *quorum sensing*, estimulada por las propias células de la población fúngica. Éstas

producirían de manera individual pequeñas moléculas de señalización que informarían al resto acerca de la densidad de la población (Braunsdorf *et al.*, 2016). La estimulación inicial de la quimioatracción para la formación de un quórum adecuado ha sido descrito en numerosos tipos celulares, constituyendo una estrategia de sociabilidad en organismos como bacterias (Sourjik, 2012) o amebas (Annesley y Fisher, 2009). De igual manera, aquí se propone que las teliosporas de *S. scitamineum* que comienzan a germinar deben producir una señal de quórum que favorezca la agregación de un gran número de células, lo que demoraría el ataque hasta garantizar un tamaño poblacional adecuado para la infección (Hogan, 2006).

Por otro lado, de igual manera que en las HMMG, fue detectada actividad degradativa (quitinasa y β -1,3/ β -1,4-glucanasa) en los extractos libres de células obtenidos a partir de las teliosporas, cuyos niveles variaron tras el contacto con las glicoproteínas (Figura 61). Las actividades β -1,4-glucanasa y quitinasa producidas por las teliosporas fueron completamente inhibidas tras 3 h de contacto con las glicoproteínas.

La pared celular fúngica es una estructura altamente dinámica y cambiante, por ejemplo, durante la división celular en levaduras o durante la

germinación y la formación de ramificaciones y septos en las hifas en hongos filamentosos. El grado de plasticidad de la pared celular depende de la actividad enzimática degradativa que actúa sobre ella (Adams, 2004). Se ha demostrado que muchas de las hidrolasas que actúan sobre la pared fúngica exhiben actividad quitinasa o glucanasa, las cuales están altamente reguladas.

La interrupción de la actividad quitinasa en hongos produce una disminución en la tasa de germinación de las teliosporas y en el crecimiento de las hifas (Takaya *et al.*, 1998). Por ello se propone que la actividad quitinasa contenida en las teliosporas debe ser inactivada por las glicoproteínas HMMG con el fin de bloquear su germinación. Por otro lado, la mayoría de los hongos producen enzimas con actividad β -1,4-glucanasa capaces de degradar la celulosa de las paredes vegetales (Nevalainen y Penttilä, 1995), y, por ello, la inhibición de la actividad β -1,4-glucanasa en las células de *S. scitamineum* por HMMG debe reducir irremediablemente la virulencia del patógeno, de igual manera que la supresión de la misma enzima producida por *Botrytis cinerea* reduce la susceptibilidad de las plantas de tomate al ataque de este patógeno (Flors, 2007). El incremento de la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa tras la incubación con las HMMG del cv. resistente, sugiere que la planta podría

beneficiarse de la acción degradativa que esta enzima ejerce sobre la pared de las células fúngicas.

Señal de quórum o de falso quórum

En muchos casos, las moléculas *quorum sensing* o QSMs (*quorum-sensing molecules*) median interacciones interespecíficas. Es el caso del efecto provocado por las acil-homoserina-lactonas liberadas a partir de biopelículas bacterianas sobre las zoosporas de la diatomea *Enteromorpha* (Joint *et al.*, 2002) o la acción de la arginasa glicosilada producida por el hongo del líquen *Peltigera canina*, capaz de estimular el reclutamiento de células *Nostoc* durante la interacción compatible entre el hongo y el cianobionte (Díaz *et al.*, 2015). Así, del mismo modo que ocurre durante el establecimiento de relaciones interespecíficas entre otros organismos, se ha comprobado que las glicoproteínas de caña son capaces de ejercer su efecto sobre las células de *S. scitamineum*. Este efecto consiste en la citoaglutinación de las células en los puntos de infección, de igual manera que ocurre durante el establecimiento del *quorum sensing* por las FP. Pero entonces, ¿dónde radica el efecto defensivo de las glicoproteínas? En este punto se supuso que el desenlace desencadenado por las FP y las HMMG debería ser distinto.

Los experimentos de germinación en presencia de HMMG y FP (Figura 63) mostraron que las diferencias radicaban justamente en el efecto que cada una produce sobre la germinación. Mientras que las FP estimulaban eficazmente la germinación y el desarrollo celular (Figuras 63, 64 A y 65), las HMMG inhibían su germinación (Figura 64 B), como había sido anteriormente demostrado. Se propone entonces que las HMMG actuarían como una falsa señal de quórum, simulando un entorno beneficioso que desencadenaría un final fatal para la población fúngica.

De nuevo se confirma que SCA es la proteína responsable de la inhibición de la germinación (Figura 63), pero ¿es de la misma manera la arginasa fúngica la responsable de su estimulación? El porcentaje de germinación en presencia de la arginasa del hongo semi-purificada no disminuyó radicalmente, como había sido observado en presencia de la SCA, pero sin embargo, tampoco estimuló la germinación, como ocurría en presencia del total de FP. Se sospechó que la pérdida de actividad arginasa durante la semi-purificación de la enzima, podría ser responsable de estas diferencias, porque cuando se analizó el efecto de la adición conjunta de FP y SCA se observaron valores intermedios de germinación en relación a los obtenidos para cada proteína por separado.

Esto sugería que la arginasa contenida en las FP debía ser la responsable de la estimulación de la germinación porque la presencia de la misma enzima procedente de la planta (SCA), y que seguramente competía con ella por el mismo ligando de pared, disminuyó su efecto acelerador sobre la germinación.

Se valoró de nuevo la germinación en presencia de SCA y del total de FP conteniendo arginasa activa (AFA) o inactivada previamente con HgSO_4 (IFA) (ver Tabla IX), de manera que se pudiera valorar el efecto de la arginasa sobre el desarrollo de las células fúngicas sin tener que aislarla del total (Figura 69). Como se sospechaba, la arginasa activa contenida en el total de FP es la responsable de activar la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum*, mientras que la conformación inactiva de la enzima la inhibe, de la misma manera que ocurre en presencia de SCA. El hecho de que la arginasa fúngica debe estar activa para estimular la germinación puede servir a su vez como sistema de regulación de las propias células fúngicas sobre la densidad poblacional.

Los resultados mostrados en la Figura 66 confirman que debe existir un sistema que regule los niveles de germinación. Las distintas FP, obtenidas tras tiempos variables de incubación (1,5, 3, 4,5 y 6 h), no produjeron el mismo efecto

sobre la germinación a pesar de que todas contenían actividad arginasa (Figura 57). Las proteínas FP obtenidas a las 1,5 h (FP 1,5 h), que contenían moderados niveles de actividad arginasa, no modificaron el porcentaje de germinación en relación al control. Por el contrario, las FP obtenidas a las 6h (FP 6 h), que contenían los mayores niveles de actividad arginasa, estimularon fuertemente la germinación y también la estimularon levemente las FP obtenidas a las 3h (FP 3 h). Sorprendió que las FP obtenidas a las 4,5 h (FP 4,5 h), a pesar de contener más actividad arginasa que las FP 1,5 y las FP 3 h, disminuyeran la tasa de germinación de las teliosporas. Esto sugirió que, a lo largo del ciclo, algún sistema de regulación desencadenado por la propia población tendría que estar sucediendo. Esta regulación podría estar relacionada con un cambio conformacional de la arginasa fúngica que modificara su unión al ligando de pared sin afectar a su actividad. Pero, de ser así, SCA, adicionada conjuntamente al medio con las distintas FP, disminuiría la germinación más fuertemente cuando la unión de la arginasa fúngica a su ligando estuviera impedida, es decir durante la competencia con las FP 4,5 h.

Sin embargo, la SCA únicamente compitió con la arginasa de las FP en los casos en los que ésta estimulaba la germinación (es decir, cuando se encontraba contenida en las FP 3 h y FP 6 h), mientras

que adicionada conjuntamente a las FP 1,5 y 4,5 h no fue capaz de inhibir su germinación (Figura 66). Esto sugiere que el sistema de regulación que controla la densidad poblacional en la población fúngica podría basarse en un bloqueo del ligando de pared para la arginasa, más que a un cambio conformacional de la propia proteína. Esto debe ocurrir en presencia de algún componente de las FP 1,5 h y FP 4,5 h capaz de interactuar con el lugar de unión de las distintas arginasas, evitando que la germinación de las células en esos momentos dependa de agentes externos (tanto estimulantes como inhibitorios)

Por último, también podría ocurrir que algún componente contenido en las FP 1,5 h y FP 4,5 h inhibiera la actividad de todas las arginasas, incluida la SCA, de manera que ninguna estableciera una unión estable con su ligando de pared.

Los resultados obtenidos demostraron que, ya que tanto las glicoproteínas HMMG como las FP estimulan la quimioatracción y la aglutinación de las teliosporas de *S. scitamineum*, la competencia entre la arginasa fúngica y la SCA resulta clave para que el proceso desencadenado derive en una señal de quórum o de falso quórum. Pero, ¿compiten ambos tipos de arginasas por su unión al mismo ligando de pared de las

teliosporas? Y, si es así, ¿cómo es dicha competencia?

3-LA ARGINASA... ¿DE QUIÉN?

Se realizaron ensayos de ligamiento a la pared celular de SCA y FP conteniendo arginasa activa (AFA) o inactivada (IFA). Las tres proteínas estaban marcadas con FITC de manera que se valoró fácilmente la fluorescencia que desaparecía del medio de incubación en cada caso. Sorprendió que, la arginasa fúngica activa (AFA) se uniera más eficazmente a su ligando, pero lo hacía sobre un menor número de células, mientras que una menor proporción de SCA era retenida sobre un número mayor de teliosporas (Figura 67). Esto sugirió que las uniones de la SCA a través de su dominio fructofuranósido al ligando de pared deben ser más débiles e inespecíficas que las mismas en el caso de la arginasa fúngica contenida en las FP.

Posteriormente, cada una de las tres proteínas retenida sobre la pared fue incubada en presencia de las otras dos (Figura 68), para comprobar cuánta proteína marcada se movilizaba en cada caso. AFA desorbió prácticamente toda la IFA unida a la pared y a gran parte de la SCA. Esta última solo pudo movilizar parte de la IFA retenida, pero no consiguió desorber nada de AFA. Por último, la arginasa fúngica

inactivada (IFA) fue la que menos poder de desorción manifestó, ya que solo pudo liberar una mínima parte de la SCA retenida y nada de AFA.

Se demostró así que, aunque las distintas arginasas se unen al mismo ligando de pared, las uniones que con él establecen no son igual de específicas. Esto concuerda con la hipótesis de que la unión de la SCA a la pared de las teliosporas debe ser más débil que la de la arginasa fúngica, quizá debido a que usa su dominio polisacarídico para unirse al ligando peptídico de la proteína y no su dominio proteico, como se proponía anteriormente.

A su vez, la unión de la arginasa fúngica a su ligando depende directamente de su grado de actividad, ya que cuando las FP contienen IFA, ésta es fácilmente desplazada. Algo similar fue propuesto para la unión de SCA obtenida de B 42231. Ésta, al estar contenida en las HMMG de forma inactiva, se unía más débilmente a su ligando, pudiendo ser fácilmente desalojada por otras moléculas de SCA cuando la concentración en el medio de incubación incrementaba (Figura 146). Se concluye así que el grado de actividad de la arginasa fúngica influye en la fuerza de unión entre la proteína y su ligando, lo cual se relaciona a su vez con el efecto que provocan ambas conformaciones sobre la germinación de las teliosporas (Figura 69), ya que solo la

arginasa activa es capaz de estimularla. La unión de AFA a la pared de las teliosporas muestra que la enzima se distribuye de manera polarizada en las células, lo que podría relacionarse con la localización del poro germinativo, y muy marcadamente en las hifas (Figura 70).

Por otro lado, se deduce que una mayor afinidad de la enzima fúngica por el ligando de pared en las teliosporas significa que SCA se une más difícilmente a su ligando de pared si la arginasa del hongo ya está presente. Por eso, la producción constitutiva de SCA por parte de las plantas del cv. resistente, conllevaría la unión temprana de la enzima a su ligando de pared. Al bloquear la germinación de las células, evitaría la producción de arginasa fúngica y la cascada de señalización desencadenada por ésta. Sin embargo, la ausencia de SCA activa en las glicoproteínas producidas por las plantas del cv. susceptible conllevaría la liberación de arginasa fúngica y la germinación de las teliosporas. El proceso se esquematiza en la Figura 148.

Así, se confirma que la producción temprana de SCA parece clave para que las HMMG desencadenen una señal de falso quórum eficaz sobre la población fúngica, basada en la quimioatracción-citoaglutinación de las teliosporas, la

destrucción de sus paredes celulares y la inhibición de su germinación.

Figura 148

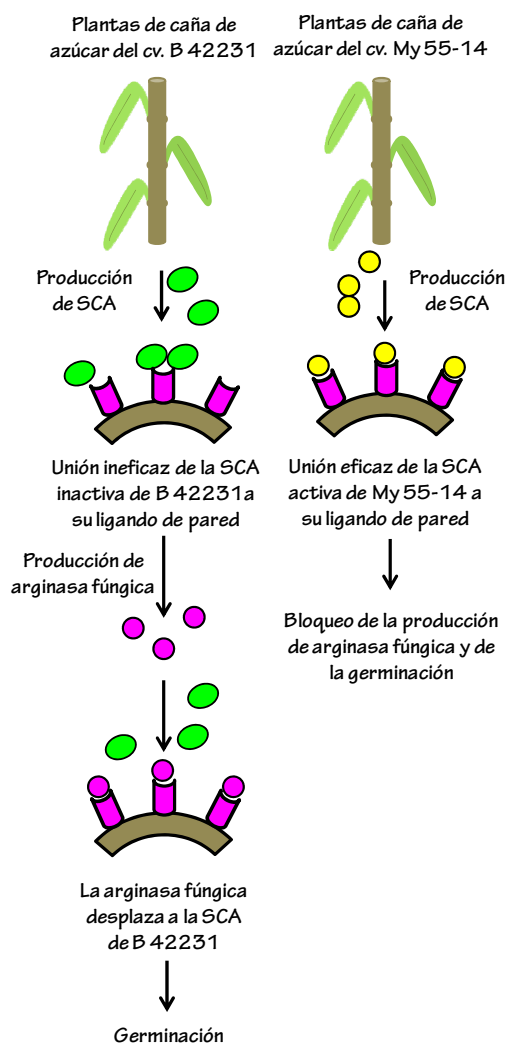


Figura 148. Esquema que representa los efectos que desencadenan la unión de la SCA del cv. B 42231 o la SCA del cv. My 55-14 a su ligando de pared de las teliosporas. Representando (🌿) las plantas de caña de azúcar, (🍄) las teliosporas del carbón, (📏) el ligando de pared para la arginasa, (🟡) la SCA de My 55-14, (🟢) la SCA de B 42231 y (🟣) la arginasa fúngica.

Llegados a este punto cabe preguntarse, ¿por medio de qué mecanismos ejercen su acción las HMMG? ¿Cómo estimulan el desplazamiento de las células? ¿Cómo inhiben la germinación de las teliosporas para evitar la infección? Se confirmó que variaciones en la organización y desorganización del citoesqueleto en las células fúngicas resultan claves para llevar a cabo estos procesos.

4-LAS GLICOPROTEÍNAS ORGANIZAN EL CITOESQUELETO DE LAS TELIOSPORAS PARA ESTIMULAR SU MOTILIDAD Y LO DESORGANIZAN PARA EVITAR SU GERMINACIÓN

La actina, la miosina y los microtúbulos (MT) fueron proteínas detectadas en el interior de las teliosporas de *S. scitamineum* donde se ha comprobado que cumplen diversas e importantes funciones durante el desarrollo y el crecimiento del patógeno. Las tres han sido descritas en otros hongos filamentosos como *U. maydis*, cuya organización citoesqueletal parece en algunos puntos más cercana a la de eucariotas superiores que a la de levaduras (Xiang y Plamann, 2003).

Una proteína de aproximadamente 50 kDa fue reconocida por anticuerpos anti-actina de organismos eucariotas a partir del

lisado celular de *S. scitamineum* (Figura 78). Tras el protocolo de *Western Blotting* aplicado para la detección de miosina en las muestras correspondientes al lisado de teliosporas (Figura 79), los anticuerpos utilizados reconocieron las cadenas pesadas IIA y IIB (en torno a los 170-180 kDa) y la cadena ligera (75 kDa) de miosina II no muscular, demostrando que esta proteína existe y debe cumplir una función en el interior de las células fúngicas. Finalmente, tras el proceso de semi-purificación de la tubulina monomérica, ésta fue detectada por anticuerpos específicos contra la tubulina acetilada (Figura 91) revelando la presencia de una proteína de ≈ 55 kDa que también fue identificada tras el revelado del gel PAGE-SDS en presencia de nitrato de plata (Figura 90).

La utilización de agentes bloqueantes de la funcionalidad del citoesqueleto demostró que éste debe encontrarse perfectamente organizado en el interior de las teliosporas de *S. scitamineum* para que tengan lugar importantes procesos, como el movimiento y la germinación. La incubación de las teliosporas en presencia de Fal, Lat A, Ble y Noc desencadenó el bloqueo de ambos eventos.

4.1-IMPLICACIÓN DE LA ACTINA Y LA MIOSINA EN LA QUIMIOTAXIS

En este trabajo se propone que el citoesqueleto en las células de *S. scitamineum* está implicado en el desplazamiento de las células hacia el agente quimiotáctico (bien sea éste las glicoproteínas HMMG, bien las FP).

Numerosos modelos de quimiotaxis han sido descritos durante la interacción planta-patógeno, donde la motilidad constituye un rasgo importante de virulencia (Yao y Alen, 2006). La quimiotaxis en eucariotas implica la diferenciación de dos polos celulares durante la migración: uno dirigido hacia la fuente de quimioattractante, a favor de gradiente, y el otro en la dirección opuesta. Estos polos muestran diferencias en la distribución de sus componentes, concretamente en aquellos implicados en la señalización y en la reordenación de las proteínas del citoesqueleto, en plantas y animales (Apodaca *et al.*, 2012; Schwarzerová *et al.*, 2010; Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). Así, durante la quimiotaxis, el establecimiento de una asimetría celular constituye la base del movimiento polarizado.

Las micrografías obtenidas por TEM (Figura 71) y SEM (Figura 72) demostraron la ausencia de estructuras externas relacionadas con la motilidad en teliosporas previamente expuestas al quimioattractante. Destacó, sin embargo, la

presencia de invaginaciones, claramente visibles, en uno de los polos celulares. Se hipotetizó que estas invaginaciones surgían como resultado de reorganizaciones del citoesqueleto con el fin de dirigir a la célula hacia el agente quimioattractante.

La organización del citoesqueleto en ausencia de formación de protusiones ha sido también observada durante la migración de las células *Nostoc* en el líquen *Peltigera canina* (Díaz *et al.*, 2015) hacia la lectina producida por el talo liquénico. La utilización de inhibidores específicos de la funcionalidad de la actina y la miosina bloquean el movimiento de estas células, por lo que estos autores han establecido que el desplazamiento debe ser consecuencia única de la reorganización del citoesqueleto en el fotobionte. De la misma manera, el desplazamiento de las teliosporas de *S. scitamineum* se vio radicalmente disminuido en presencia de inhibidores de la organización del citoesqueleto (Lat A, Fal y Ble) (Figura 73), lo que confirmó que éste debía estar directamente implicado en la motilidad de las teliosporas hacia el agente quimioattractante.

Las GTPasas como mediadoras de la señal de organización del citoesqueleto

Las GTPasas están tradicionalmente descritas como vínculo de unión entre la

recepción de una señal externa y su transducción en el interior celular (Raftopoulou y Hall, 2004). Así, las GTPasas Rho actúan como interruptores de grandes cascadas de señalización por alternancia de su estado activo e inactivo, uniéndose a GTP o GDP respectivamente (Caron, 2003). Las señales derivan a menudo de ligandos extracelulares que activan factores GEF que catalizan la sustitución de GDP por GTP en las GTPasas, permitiendo su activación. Sólo en su conformación activa, unidas a GTP, las proteínas Rho pueden interaccionar con efectores específicos en el interior celular (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Entre todas las posibles respuestas intracelulares, su actividad influye directamente en la organización del citoesqueleto (Ridley y Hall, 1992). Por ello, se trató de confirmar si la organización del citoesqueleto en las células de *S. scitamineum* era consecuencia de una cascada de señalización desencadenada por la acción de las proteínas GTPasas.

Se trató de revertir el efecto inhibitorio de la Lat A sobre la quimioataxis por medio de la adición al medio de GTP (Figura 74). El nucleótido revertió parcialmente el efecto inhibitorio de la Lat A, probablemente por medio de la activación de Rho, pero no lo hizo la adición de GTP γ S, análogo no hidrolizable del GTP que mantiene GTPasa activada (Strange, 2010), ni la

adición de GDP β S, desactivador de las GTPasas Rho (Peterson *et al.*, 1999). Estos resultados indican que el GTP γ S podría comportarse como un fuerte activador de Rho, de manera que las células podrían responder a esta hiperactivación mediante una inactivación de la ruta. Esto sugiere que las proteínas Rho deben desempeñar un papel importante como eje de modulación de las respuestas celulares a diferentes formas de estrés (Delley y Hall, 1999). Por otro lado, el GDP β S bloquea la cascada de señalización, posiblemente por medio de la inhibición del intercambio GDP-GTP en Rho. Como resultado, en ambos casos, la transducción de la cascada permanece bloqueada en las células.

Muchos GEFs son catalíticamente inactivos cuando forman complejos con la miosina (Lee *et al.*, 2010). Se ha descrito que la Ble puede ejercer su acción inhibitoria sobre la funcionalidad de la miosina mediante la liberación de GEFs que estimulan la activación de proteínas Rac-GTPasas en muchos tipos celulares (Lee *et al.*, 2010; Katsumi *et al.*, 2002; Loudon *et al.*, 2006; Even-Ram *et al.*, 2007). Se sugiere así que en presencia de Ble debe estar activa la ruta dirigida por la proteína Rac-GTPasa, la cual desencadena la inhibición de la proteína quinasa responsable de la fosforilación (y activación) de la miosina (Van Leeuwen *et al.*, 1999; Caron,

2003), como se esquematiza en la Figura 149.

Se analizó si el GTP y sus análogos provocaban la reversión del efecto inhibitorio inducido por Ble (Figura 75). Debido a que ésta puede inducir la disrupción de las interacciones entre la actina y la miosina (Wang *et al.* 2008), la integridad de la F-actina fue asegurada en presencia de Fal. La adición de GTP al medio de incubación conteniendo Ble provocó una inhibición sobre la motilidad de las teliosporas aún mayor que la que provocaba la droga por sí sola, probablemente por medio de la estimulación de la ruta que deriva en la desfosforilación de la miosina. Sin embargo, la presencia de GDP β S, GTP γ S y, sobre todo, la adición conjunta de GTP γ S y GTP lograron revertir el efecto inhibitorio de la droga. El GDP β S estaría bloqueando la ruta que inhibe la funcionalidad de la miosina, por lo que ésta debe encontrarse activa en presencia del análogo. La recuperación de la movilidad en presencia de GTP γ S podría ser consecuencia de nuevo de una inactivación de la ruta por hiperactivación de la proteína Rac-GTPasa la cual evitaría el bloqueo de la quinasa que fosforila (y activa) la miosina. Como las acciones de las GTPasas Rho y Rac suelen ser antagonistas (Caron 2003), la inactivación de Rac llevaría a su vez a la activación de la ruta desencadenada por Rho (Figura 149). Por ello el desplazamiento celular se estimula aún más

durante la incubación simultánea en presencia de GTP γ S y GTP.

Figura 149

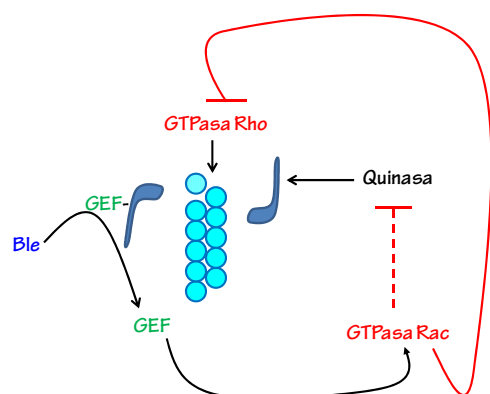


Figura 149. Esquema que representa cómo la presencia de Ble podría desencadenar la activación de la GTPasa Rac por medio de la liberación de sus GEF. La actividad de Rac-GTPasa bloquearía la fosforilación de la miosina por la quinasa correspondiente. A su vez, la inhibición de la GTPasa Rac estimularía la activación de la GTPasa Rho y la polimerización de la actina. Representando (■) la miosina II y (●) los monómeros de actina.

Sin embargo, de nuevo la hipótesis acerca del modo de acción de las GTPasas en la transducción de la señal que desencadena la reorganización del citoesqueleto en las células de *S. scitamineum* es altamente especulativa y necesariamente debe ser contrastada.

Hipótesis de generación de movimiento en las teliosporas de *S. scitamineum*

Durante la migración celular, la formación de protrusiones como resultado de la

reorganización de los filamentos de actina por acción de la miosina II ha sido descrita en diferentes tipos celulares eucariotas, incluyendo *Dictyostelium*, leucocitos o fibroblastos (Bosgraaf y van Haastert, 2006; Eddy *et al.*, 2000; Vicente-Manzanares *et al.*, 2008). La formación de filopodios y lamelipodios en todos estos tipos celulares implica la translocación de los filamentos hacia la parte posterior de la protrusión como resultado del flujo retrógrado de la actina (Case y Waterman, 2015) para crear en el polo de avance un espacio libre que permita su polimerización en el extremo más (+) del filamento (Choi *et al.*, 2008). En base a lo que ocurre durante el desplazamiento celular en otros organismos, un modelo de movimiento basado en la reorganización de la F-actina en colaboración con la miosina II (sin formación de protrusiones) ha sido descrito para la migración de las células de *S. scitamineum* y se esquematiza en la Figura 150.

En primer lugar, el movimiento de translocación de los filamentos de actina hacia su extremo negativo produciría la invaginación de uno de los polos celulares (Figura 150 A). La translocación a su vez debe ser originada por el movimiento de empuje de la miosina II, la cual desplaza los microfilamentos hacia el eje ecuatorial de la célula (extremo menos (-) del filamento). Como condición *sine qua non*, los filamentos de actina deben estar unidos a la membrana

plasmática en uno de los polos celulares mediante proteínas de anclaje a la membrana. De esta manera, cuando los filamentos son “empujados” hacia el interior celular, éstos “tiran” de la membrana plasmática, produciendo la invaginación en uno de los polos.

Una vez producida la invaginación, la espora debe moverse hacia delante (Figura

150 B). Como la polimerización no se interrumpe, el extremo más (+) situado en el extremo no invaginado crece rápidamente, por lo que termina “empujando” la membrana celular, deshaciendo la invaginación producida en el extremo posterior, favoreciendo el avance de la teliospora y permitiendo que el ciclo comience de nuevo.

Figura 150

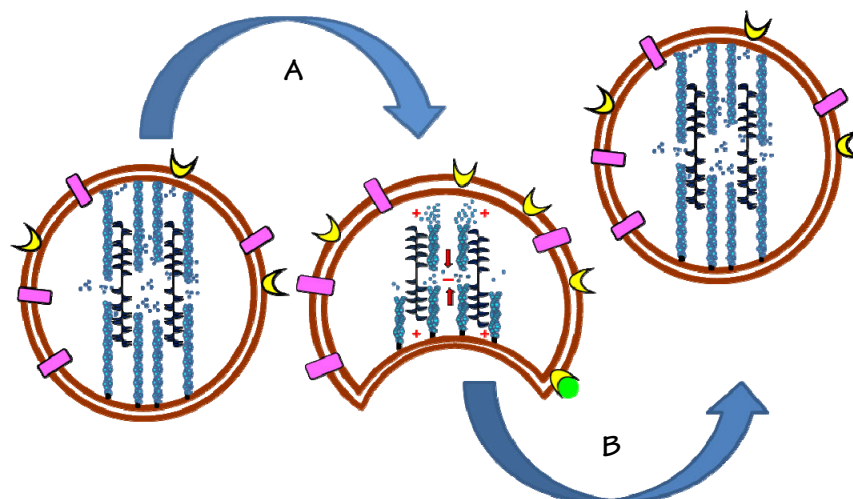






Figura 150. Hipótesis del movimiento de las teliosporas de *S. scitamineum* durante su desplazamiento por quimiotaxis, basado en continuos ciclos de translocación hacia el plano ecuatorial (A) y posterior polimerización hacia el polo de avance (B) de los filamentos de actina. Representando () la miosina II, () la actina G, () la F-actina, () la dirección del flujo retrógrado, (+) el extremo más del filamento de actina y (-) el extremo menos del filamento de actina. El proceso completo es detallado en el texto.

Interacción entre la F-actina y los MT

Se observó, por otro lado, que los MT estaban implicados en la movilidad de las

teliosporas ya que el nocodazol (Noc) disminuyó su desplazamiento de manera máxima a la concentración de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 96). También se observó que el

tamaño de las citoaglutinaciones formadas en presencia de la droga disminuían, probablemente como derivación del efecto inhibitorio del Noc sobre la quimiotaxis (Figura 97).

Se ha comprobado cómo las interacciones dinámicas entre los MT y los filamentos de actina dirigen el proceso de migración en fibroblastos, donde la completa despolimerización de los MT bloquea totalmente su desplazamiento (Waterman-Storer y Salmon, 1999). La interacción entre los MT y los filamentos de actina es un fenómeno básico que subyace a todos los procesos celulares en los cuales es necesario establecer y mantener la asimetría celular (Rodríguez *et al.*, 2003), siendo pocos los tipos celulares en los cuales se haya encontrado que el movimiento celular sea totalmente independiente de los MT (Waterman-Storer y Salmon, 1999).

La interacción de la actina y los MT en las células de *S. scitamineum* ha sido demostrada en este trabajo. Los experimentos de marcaje de F-actina con Fal conjugada a Alexa Fluor® 488 mostraron diferencias en la organización de los filamentos de actina en ausencia y en presencia de Noc $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 99). La disminución en el número de células que presentaban una disposición asimétrica de la F-actina en el interior celular en presencia

del inhibidor confirmó la existencia de una interacción entre los microfilamentos y los MT durante el establecimiento de la polaridad celular en *S. scitamineum*.

4.2-IMPLICACIÓN DEL CITOESQUELETO EN LA GERMINACIÓN

Se comprobó que durante la germinación era necesaria la presencia de una distribución organizada de los filamentos de F-actina en las células fúngicas. La inhibición del proceso germinativo por acción de Fal y Lat A sugirió que la alternancia dinámica entre polimerización y despolimerización de los filamentos podría ser responsable de la emergencia de los tubos germinativos en las teliosporas (Figura 76). En especial la polimerización parece imprescindible, ya que la germinación quedaba totalmente bloqueada en presencia de Lat A.

La arquitectura del conjunto de actina fue revelada en los primeros estadios del ciclo de vida del patógeno (Figura 87), lo que confirmó que una distribución organizada de la F-actina debe ser condicionante clave para el progreso adecuado de las células. La información recogida a partir de las micrografías obtenidas por microscopía confocal permitió elaborar un esquema acerca de la organización de los filamentos durante las primeras etapas del desarrollo (Figura 151).

Figura 151

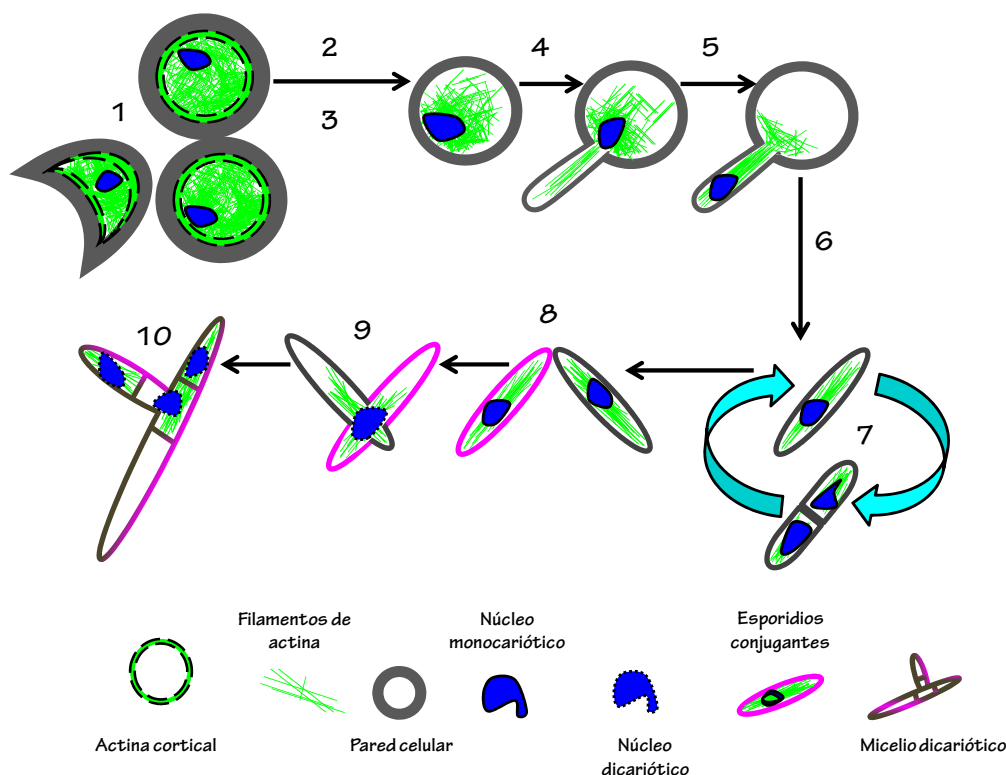


Figura 151. Esquema que representa la organización de la actina durante las primeras etapas de germinación de teliosporas de *S. scitamineum*. Aglutinación de las teliosporas en el punto de infección donde se dispara la germinación (1), adelgazamiento de la pared celular (2), pérdida de la actina cortical y migración del núcleo hacia el polo germinativo (3), emergencia de la hifa (4) y translocación del núcleo hacia el interior del tubo germinativo (5), liberación de esporidios (6) y división de los mismos por gemación (7), conjugación de esporidios compatibles (+ y -) (8), formación (9) y crecimiento de micelio dicariótico (10).

La F-actina y la miosina fueron localizadas conjuntamente *in situ* en las teliosporas durante las primeras etapas de su germinación. Se comprobó que la actina y la miosina se encuentran distribuidas por todo el citoplasma celular (incluyendo la zona cortical en el caso de la actina) en las teliosporas (Figura 80). Ambas proteínas co-localizan en el interior celular, lo cual

sugiere que actúan conjuntamente. Tras la emergencia de la hifa se observa que el marcaje de la actina tiende a desaparecer en la teliospora (principalmente en la región cortical), intensificándose en el citoplasma del tubo germinativo (Figura 81), cuyo crecimiento entonces se encuentra activo. Así, las teliosporas transportan nuevo material en dirección al extremo de hifa

naciente, como ocurre comunmente en otros hongos filamentosos (Banuett & Herskowitz, 2002). Sin embargo, a la vez que el contenido celular es translocado al interior del tubo germinativo emergente, la teliospora va perdiendo su función y degenera, diluyéndose entonces poco a poco el marcaje de la F-actina.

Por otro lado, se investigó el papel de los MT en la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum*. Los experimentos de germinación en presencia de Noc mostraron que la droga bloquea la liberación de esporidios al medio, probablemente mediante su interacción con los MT, pero no evita la emergencia de los tubos germinativos (Figura 94). De esta manera, se demostró que los MT en las células de *S. scitamineum* no parecen necesarios para la elongación de las hifas, pero parecen esenciales para la liberación de éstas al medio, como ha sido observado en otros tipos celulares (Snyder *et al.*, 1991; Jacobs *et al.*, 1988; Page y Snyder, 1993; Åström *et al.*, 1995; Pillai *et al.*, 1992).

Sin embargo, los ensayos de germinación a lo largo de 18 h de incubación en presencia de Lat A o Noc (Figura 95) demostraron que Lat A inhibe la aparición tanto de tubos germinativos como de esporidios. Estos resultados sugieren que una organización de la actina previa a la germinación parece ser necesaria para la

aparición del tubo germinativo, mientras que los MT parecen indispensables para su liberación al medio pero no para su emergencia a partir de la teliospora.

Así, nuestros resultados evidencian que la elongación de los tubos germinativos y la migración nuclear podrían ser procesos separados temporal y mecánicamente, el primero derivado de la organización de la F-actina; el segundo, de la polimerización de los MT. Durante la germinación los tubos son formados pero no deben ser liberados hasta que el núcleo alcance la hifa. De esta manera, los MT, desorganizados por la acción del Noc, no podrían posicionar al núcleo para su migración a través del poro germinativo, bloqueándose entonces la liberación de esporidios al medio.

Experimentos realizados en levaduras muestran cómo la organización de los MT no parece esencial para el surgimiento de las yemas (Snyder *et al.*, 1991) pero sí para la segregación nuclear a las células hijas tras su división (Jacobs *et al.*, 1988; Page y Snyder, 1993). También se observa un retraso en la migración nuclear durante el desarrollo de granos de polen de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana alata* en presencia de orizalina, un inhibidor específico de la polarización de los MT, a pesar de que la droga no tiene efecto inhibitorio sobre la elongación del tubo polínico (Åström *et al.*, 1995). De igual manera, los procesos de

división y/o translocación del núcleo en zoosporas de *Macrocystis pyrifera* no comienzan hasta que finaliza la elongación del tubo germinativo, demostrando que son eventos temporalmente diferenciados (Pillai *et al.*, 1992). Los MT también parecen ser requeridos para la generación del fragmoplasto durante la división celular en plantas (Murata *et al.*, 2013). De esta manera, una correcta polimerización de los MT podría ser necesaria para la septación de la hifa, proporcionando otra hipótesis de por qué los tubos germinativos no son liberados al medio en presencia de Noc.

La organización microtubular en las células de *S. scitamineum* fue también analizada a partir de la toma de imágenes por microscopía confocal (Figuras 93, 101, 102, 107 y 108) las cuales demostraron cómo la polarización de los MT aparece como un proceso clave durante las primeras etapas de la germinación de las teliosporas. A partir de los resultados obtenidos se elaboró una hipótesis acerca del papel que desempeñan los MT en la germinación de las teliosporas, esquematizada en la Figura 152. Tanto la polimerización como la polarización de los MT son eventos necesarios para lograr un correcto posicionamiento del núcleo antes de la germinación, de acuerdo con el modelo clásico de migración nuclear (Xiang *et al.*, 1994; Morris, 2000; Steinberg *et al.*, 2001; Baluška y Barlow, 1993; Jacobs *et*

al., 1988). De igual manera, durante la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* se observa el establecimiento de un punto de máxima polaridad (PMP) en la organización de los MT, indicando que estos deben ser imprescindibles para una correcta migración del núcleo. Éste, condensado, es dirigido por el citoesqueleto hacia el tubo germinativo emergente (Figura 152).

Los MT posicionan orgánulos mediante fuerzas de empuje, de tracción o de deslizamiento (ToliT-Nørrelykke, 2008). Las fuerzas de tracción y deslizamiento predominan durante la translocación nuclear, como ocurre durante el movimiento de núcleo durante la gemación de las células de *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 2003), mientras que los mecanismos de tracción son necesarios cuando las distancias que deben recorrer los orgánulos son grandes o cuando la geometría celular es asimétrica y/o compleja (ToliT-Nørrelykke, 2008). Los MT del PMP, en la base de la hifa, coinciden con la localización del núcleo en ese momento, por lo que podrían ser responsables de las fuerzas de deslizamiento generadas para lograr el desplazamiento del núcleo a través del poro germinativo. Además, otro punto PMP se observa en el ápice de la hifa en crecimiento, indicando que una fuerza adicional debe ser necesaria para "tirar" del núcleo con el fin de completar la migración (ver Figura 107 b)

Figura 152

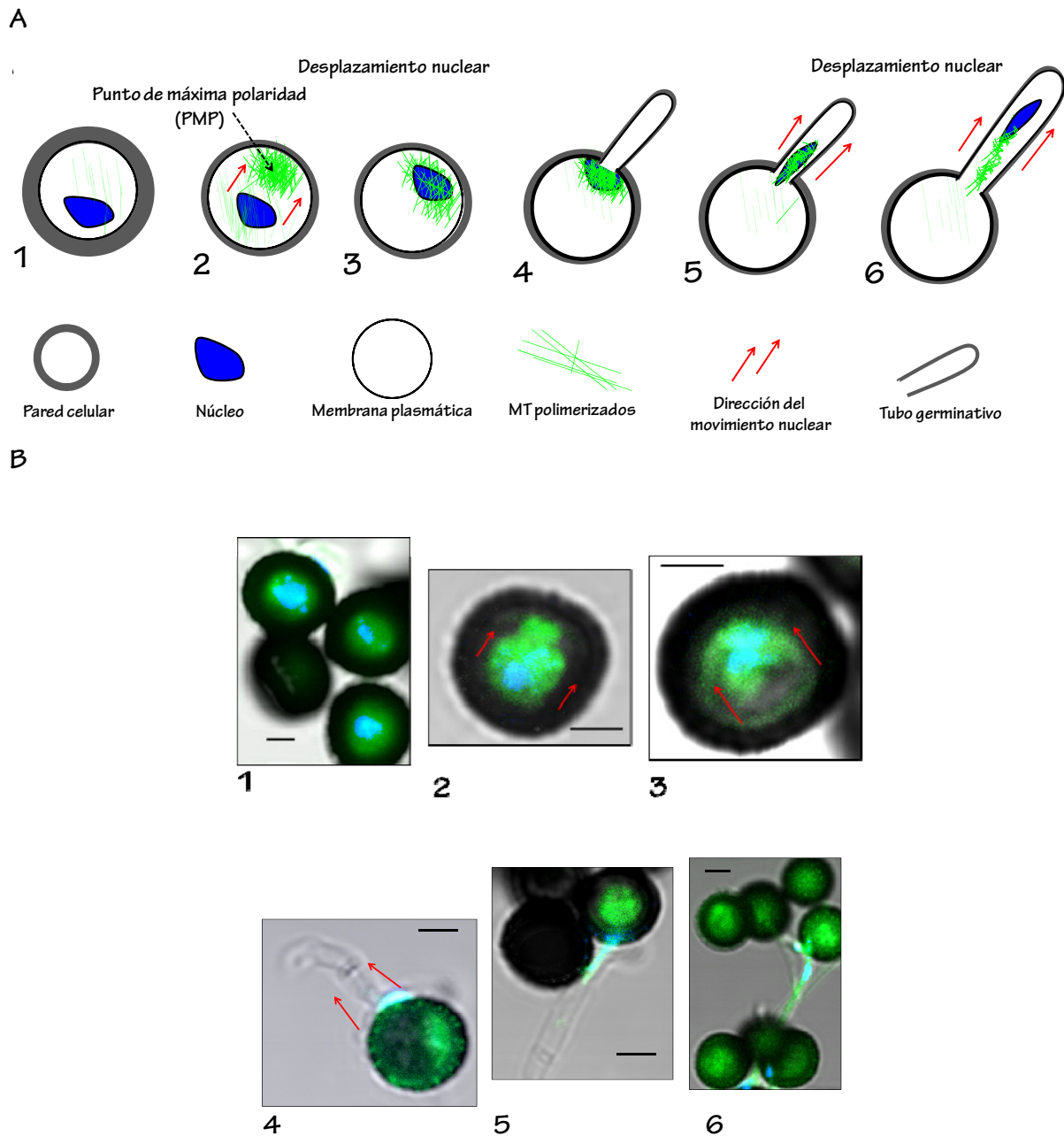


Figura 152. Esquema que representa la organización de los MT durante las primeras etapas de germinación de teliosporas de *S. scitamineum*. Ausencia de polarización microtubular al comienzo de la germinación (1), establecimiento de un punto de máxima polaridad (PMP) de los MT correspondiente a la localización del poro germinativo (2), polarización de los MT en la célula que posicionan al núcleo en la base de la hifa emergente (3), translocación del núcleo a través del poro germinativo (4), desplazamiento nuclear a lo largo del tubo germinativo (5, 6) (A). Micrografías obtenidas por microscopía confocal que corresponden a cada uno de los estadios descritos en (A) y que muestran la localización por fluorescencia DAPI del núcleo (en azul) y la α -tubulina (en verde) en teliosporas incubadas en agua destilada. La barras de escala indican 2 μ m (B).

4.3-EFECTO DE HMMG SOBRE LA ORGANIZACIÓN Y DESORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO

El efecto diferencial de las distintas glicoproteínas HMMG sobre la germinación había sido previamente demostrado (Figura 46). Las HMMG procedentes de plantas no inoculadas e inoculadas del cv. resistente provocaron un efecto inhibitorio más potente sobre la germinación de las teliosporas que las mismas procedentes del cv. susceptible.

Por otro lado, se observó que muchos de los tubos germinativos y esporidios formados durante la germinación aparecían desprovistos de material nuclear tras el contacto con las glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas del mismo cv. resistente (Figura 100 b), lo cual no ocurría en células no tratadas (Figura 100 a). Esto podría ser consecuencia de una migración fallida del núcleo hacia el poro germinativo como resultado de una disrupción en la organización de los MT, de la misma manera que ocurría en presencia de Noc (Figura 94). Esta hipótesis fue confirmada mediante el inmunomarcaje de los MT en células tratadas y no tratadas con HMMG. Mientras que las teliosporas control mostraban una distribución polarizada de los MT en el interior celular (Figura 101), las células incubadas en presencia de HMMG producidas por el cv. resistente

presentaban una organización de los MT no polarizada (Figura 102). Concretamente, las glicoproteínas de las plantas no inoculadas del cv. resistente fueron las que más efecto causaron sobre la despolarización del citoesqueleto de tubulina (Figura 103).

Además, las glicoproteínas de My 55-14 estimularon la descondensación y la fragmentación nuclear en las células de *S. scitamineum* (Figuras 104, 105 y 106). Se propone en este trabajo que la descondensación nuclear observada tras el tratamiento de las células de *S. scitamineum* con HMMG de plantas del cv. resistente podría ser consecuencia de una desorganización previa de los MT. Estas alteraciones nucleares, a su vez, podrían ser responsables del fallo en la translocación nuclear a través del poro germinativo en presencia de HMMG de My 55-14, lo que provocaría la liberación de esporidios anucleados al medio (Figura 100 b) durante la germinación.

Estudios previos indican que una condensación de la cromatina facilita el movimiento del núcleo así como algunos cambios en su morfología (Gerlitz *et al.*, 2013) necesarios para procesos como la migración celular (Gerlitz y Bustin, 2010) o la mitosis en hongos y levaduras (Straube *et al.*, 2005; Bakerspigel, 1957). En linfocitos T, la despolimerización de la F-actina se

relaciona con la disminución del tamaño nuclear mientras que la despolimerización nuclear incrementa la talla nuclear (Lu *et al.*, 2012).

Fischer, en 1999, especula que la alteración de la organización nuclear en estadios tempranos del desarrollo del hongo patógeno *Magnaporthe grisea* podría ser fundamental para prevenir la infección de la planta. De igual manera, el posicionamiento y la migración nuclear es un proceso dependiente de los MT en *U. maydis* (Steinberg *et al.*, 2001) y levaduras (Tran *et al.*, 2001), y la despolimerización de los MT conlleva a alteraciones no reversibles en relación al posicionamiento nuclear en células de *Nicotiana sylvestris* (Joos *et al.*, 1994). Además, existe un acoplamiento mecánico entre los MT y la membrana nuclear (Russell *et al.*, 1991; King *et al.*, 2008). La interacción entre ambos componente es dinámica, de manera que los MT estimulan la desorganización de la membrana nuclear durante el progreso del ciclo celular (Mogessie y Schuh, 2014).

Se sugiere, de igual manera, que el efecto de las HMMG producidas por el cv. My 55-14 podría desencadenar una rotura de la membrana nuclear por medio de la desorganización de los MT, lo que conllevaría irremediablemente a una descondensación nuclear. A su vez, el núcleo, no condensado, no podría translocarse al tubo germinativo,

ya formado. Las Figuras 107 y 108 reflejan cómo la ausencia de una distribución organizada de los MT en las teliosporas bloquea la migración nuclear y la germinación en las células de *S. scitamineum*.

El proceso general desencadenado por las HMMG sobre la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* por medio de su acción sobre los MT se esquematiza en la Figura 153. La SCA producida por las plantas no inoculadas del cv. resistente, como responsable de la inhibición de la germinación, podría serlo también de la desorganización de los MT en las teliosporas. Para ello, la enzima ha de producirse constitutivamente de manera activa, de tal manera que se una a su ligando de pared en la pared de las teliosporas antes de que lo haga la arginasa fúngica, la cual posee más afinidad por el mismo ligando. La SCA estimularía la citoaglutinación y evitaría la germinación por medio de la desorganización microtubular y nuclear. Sin embargo, la SCA es producida constitutivamente por las plantas del cv. susceptible en su conformación inactiva, de manera que no bloquea la germinación ni la síntesis de arginasa fúngica.

Las HMMG desorganizan los MT mientras que, por el contrario, la actina parece polarizarse en presencia de las glicoproteínas de defensa. La localización de

la actina y la miosina fúngicas mediante inmunomarcaje (Figuras 82, 83 y 84) evidencian que la distribución polarizada del complejo acto-miosina parece estimularse

en las teliosporas tras el contacto con las glicoproteínas HMMG procedentes de plantas no inoculadas de My 55-14.

Figura 153

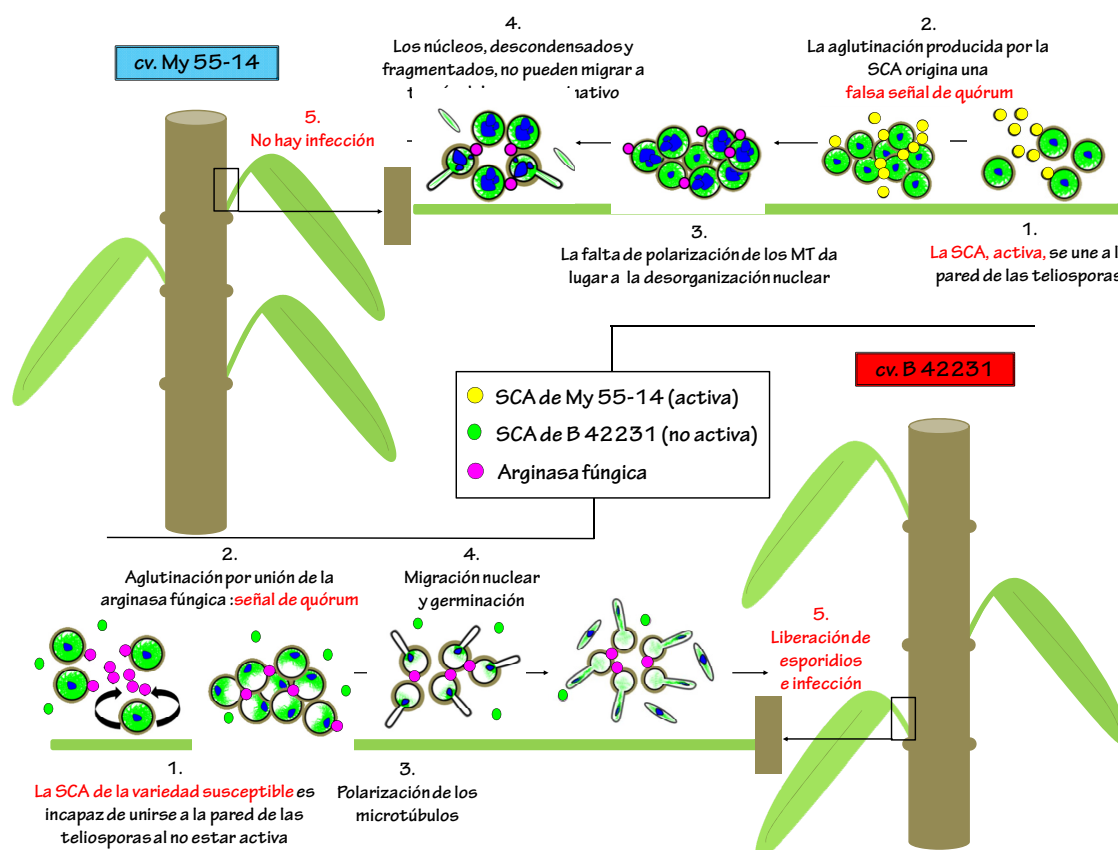


Figura 153. Esquema que representa el papel que las SCAs producidas por plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231 podrían desempeñar en el establecimiento de la infección por *S. scitamineum*. La enzima producida por el cv. resistente (que se sintetiza en su configuración activa) se uniría tempranamente a su ligando de pared de las teliosporas evitando la germinación y la producción de arginasa fúngica. Sin embargo, la SCA (inactiva) producida por las plantas del cv. susceptible, no podría evitar la germinación ni la producción de arginasa fúngica. Esta última estimularía la infección en las plantas de B 42231.

Si el proceso de quimiotaxis estimulado por las glicoproteínas es el

desencadenante de la respuesta defensiva de las plantas a la infección, y si el

movimiento de las teliosporas requiere de la presencia de un citoesqueleto de actina organizado, es lógico pensar que las glicoproteínas actúen estimulando una organización de la actina en las células que favorezca su desplazamiento hacia los puntos de citoaglutinación.

Las variaciones en los niveles de polimerización de la actina fueron analizadas en presencia simultánea de HMMG e inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto (Lat A, Ble y Fal) (Figura 86). Las tres drogas inhibieron significativamente el porcentaje de células que presentaban una disposición polarizada de la fluorescencia en relación a las células control y a aquellas incubadas en presencia de HMMG. En concreto, la fluorescencia correspondiente a la F-actina desaparecía casi completamente durante la incubación con Lat A (Figura 85). También la detección de la actina fúngica por TEM (Figura 88) confirmó como Lat A es capaz de desorganizar los filamentos de actina en las teliosporas de *S. scitamineum*. Éstos, en ausencia de la droga, se organizaban en la zona cortical, aún más en presencia de HMMG.

Resultó interesante que las glicoproteínas incrementaran el porcentaje de teliosporas que mostraban una distribución asimétrica de la F-actina (Figura 86 a), a pesar de que las mismas

contenían una menor cantidad de actina polimerizada por célula (Figura 86 d). Esto sugiere que las glicoproteínas reorganizan los filamentos de actina para estimular la quimiotaxis pero desorganizan los mismos implicados en la germinación, probablemente mediante su interacción con los MT.

Se realizó un marcaje simultáneo de la actina (mediante inmunomarcaje) y el núcleo (por tinción con DAPI) de las teliosporas tras el contacto con las diferentes HMMG (Figura 89 A-H). Muchas de las células incubadas en presencia de glicoproteínas producidas por plantas no inoculadas de My 55-14 presentaban una distribución de la actina polarizada, en concordancia con los efectos ya descritos de las HMMG. Sin embargo, algunas células presentaban una polarización en forma de anillo en la zona más cortical. Ésta, acompañada de una pérdida de material nuclear, sugirió que podría haberse desencadenado la apoptosis en las células tras la exposición continuada a las glicoproteínas.

La presencia de un anillo de actina periférica (anillo apoptótico) se ha definido en numerosos tipos celulares en las etapas tempranas de la apoptosis (Mills *et al.*, 1999; Rosenblatt *et al.*, 2001). Este proceso es altamente estimulado por la presencia de ROS, acompañado de una desorganización de los MT y nuclear, e inmediatamente continuado por la pérdida

de actina polimerizada en todo el citoplasma (Marx *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 1999). La desorganización nuclear también fue observada en las células fúngicas tras su exposición a HMMG procedentes de las plantas inoculadas del cv. resistente. Se propone entonces que, las glicoproteínas de My 55-14, tras ejercer su acción quimioattractante-citoaglutinante y tras haber bloqueado la germinación de las teliosporas, desencadenarían la muerte de las células fúngicas.

Pero, ¿qué ocurriría si algunas teliosporas escapan al efecto de las glicoproteínas y logran germinar y producir esporidios infectivos? En este punto debe analizarse el efecto que las glicoproteínas provocaron sobre el crecimiento de las colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -) (Figura 53). Se comprobó que las glicoproteínas producidas por plantas inoculadas y no inoculadas del cv. resistente producen un retraso en la conjugación de esporidios compatibles, lo cual podría ser clave para frenar el establecimiento de la infección. Se ha demostrado que, en *U. maydis*, la fusión de las células durante el proceso de conjugación depende de una distribución organizada de la F-actina. Además, los MT, que no parecen afectar de manera directa a ese proceso, podrían estar implicados en el proceso de conjugación por medio de su interacción con el citoesqueleto de actina

(Fuchs *et al.*, 2005). De igual manera, la desorganización de la F-actina por parte de las glicoproteínas de defensa podría evitar la conjugación de los esporidios de *S. scitamineum*.

Así, se demuestra que las glicoproteínas HMMG procedentes de plantas del cv. resistente provocan alteraciones importantes en la organización del citoesqueleto del patógeno. Por un lado, la proteína quimioattractante contenida en las glicoproteínas HMMG estimula su polimerización, para favorecer el desplazamiento celular y por otro, la SCA parece responsable de su desorganización, ya que impide la germinación. En este punto cabe preguntarse acerca de los mecanismos por los cuales SCA desorganiza los MT para evitar la germinación fúngica.

5- SCA EJERCE SU ACCIÓN INHIBITORIA DE LA GERMINACIÓN MEDIANTE LA PRODUCCIÓN NO REGULABLE DE POLIAMINAS (PAs)

Los resultados obtenidos en relación al contenido de PAs en las células o el efecto de éstas sobre la germinación evidencian que estos reguladores podrían desempeñar un papel fundamental durante la interacción planta-patógeno.

En primer lugar, se demostró que la incubación de las teliosporas en presencia de bajas concentraciones de putrescina, PUT, (0,1 mM) promueve la liberación de esporidios durante la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* (Figura 109), a pesar de que el número de tubos germinativos permanece constante. La acumulación de esporidios conjugantes en el medio en presencia de moderadas concentraciones de PUT debe incrementar la capacidad infectiva del patógeno, sugiriendo que una producción (pequeña y regulable) de la diamina por parte de las teliosporas podría ser necesaria para el desarrollo del patógeno.

Es interesante que a una concentración 0,1 mM de la diamina los esporidios liberados tengan un tamaño medio semejante al control, mientras que los tubos germinativos muestran un mayor tamaño. Se propone que el modo de acción de la PUT en las células del patógeno deriva, al menos, en un incremento de la velocidad de elongación de los tubos germinativos (Figura 110), de manera que, para el mismo tiempo de incubación, se observa un mayor número de esporidios (de igual tamaño) en las placas incubadas con la diamina en relación al control. Si la talla media de los tubos germinativos no aumentara previamente, una estimulada liberación de esporidios iría necesariamente relacionada

con la disminución en su tamaño, lo cual podría comprometer su infectividad.

La germinación parece ser inhibida por la diamina a concentraciones más elevadas (Figura 109). Así, el efecto de PUT sobre la germinación o la infectividad del patógeno dependería, no solo de la presencia de la diamina, sino de la concentración que ésta alcanzara en el ambiente de interacción entre planta-patógeno. Cuando el nivel de concentración de PUT alcanza 10 mM, el efecto inhibitorio sobre la germinación parece revertirse. Sin embargo, no es una reversión total, ya que los tubos germinativos producidos y los esporidios liberados tienen un tamaño mucho menor en relación a las células incubadas en ausencia de la diamina (Figura 110).

Por otro lado, la PUT bloquea la polimerización de los MT (Figura 112), probablemente por medio de su conjugación a las unidades de tubulina, lo cual explicaría el incremento en el contenido de la fracción insoluble de PAs tras el tratamiento con glicoproteínas HMMG de plantas no inoculadas de la variedad resistente (Figura 119). Este "secuestro" de los MT provocaría la descondensación nuclear observada en la tinción con DAPI y el daño celular global derivado de esto, manifestado en la aparición de protoplastos y en la liberación del material celular (Figura 114). La rotura de la membrana plasmática debida

al incremento de PUT en el medio de incubación podría derivar de la activación de enzimas degradativas como las glucanasas, de la misma manera que ocurre durante el establecimiento de la interacción no compatible entre el hongo y el fotobionte en *Xanthoria parietina* (Molina *et al.*, 1998).

Sin embargo, el mecanismo biológico por el cual las PAs afectan a todos estos procesos es confuso. Se sugiere que la descondensación nuclear podría ser seguida por alteraciones en la transcripción o de fenómenos de represión. De hecho, en muchos organismos, entre los que se incluyen hongos patógenos como *Aspergillus nidulans* (Khatri y Rajam, 2007) y fitopatógenos como *Magnaporthe oryzae* (Kadotani, *et al.*, 2003), ha sido posible establecer una relación directa entre la acumulación de PAs y el silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo fúngico.

Las altas concentraciones de espermidina, SPD, también afectan negativamente a la germinación (Figura 111). Sin embargo, ésta se ve favorecida en presencia de SPD 0,1 mM tras tiempos largos de incubación, a partir de las 40 h. Paralelamente, los resultados de interacción de las PAs con los MT durante su polimerización mostraron que éstos son capaces de crecer más rápidamente en presencia de SPD (Figura 112).

Las cargas positivas deslocalizadas de las PAs favorecen su unión a proteínas cargadas, fosfolípidos o ácidos nucleicos. Debido a que pueden unirse a elementos de la membrana o del citoesqueleto proporcionando rigidez a las células (Incharoensakdi *et al.*, 2010), se propone que la presencia de moderadas concentraciones de SPD favorecen la germinación de las teliosporas, actuando como un soporte para los MT durante su polimerización.

La concentración 0,1 mM de SPD fue la que ejerció un efecto positivo sobre la germinación de las teliosporas. Sin embargo, en esta concentración, el nivel de polimerización *in vitro* de la tubulina fue similar al observado en el control, realizado en ausencia de PAs (Figura 112). Es en presencia de SPD 7,5 mM cuando la polimerización de las unidades de tubulina incrementa notablemente.

La transición entre polimerización y despolimerización de los microtúbulos es altamente dinámica. Por ello, es probable que la alta concentración de SPD favorezca una polimerización excesiva de las unidades de tubulina que dificulte la germinación. Por otro lado, la metodología aplicada al ensayo de germinación, con células vivas, no puede ser plenamente comparable con el experimento de polimerización donde se utilizó, únicamente, tubulina aislada. Estas

podrían ser las razones por las cuales las concentraciones de SPD que favorecen la polimerización y la germinación, 0,1 y 7,5 mM respectivamente, no coincidan. Lo que sí puede establecerse a partir de ambos ensayos es que concentraciones moderadas de SPD favorecen la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* por medio de su interacción con los MT.

Comúnmente, el modo de acción de *U. maydis* ha sido comparado con el de *S. scitamineum* ya que ambos patógenos causan de la enfermedad del carbón en maíz y en caña de azúcar, respectivamente. *U. maydis* desarrolla en su hospedador una fase saprofítica, no infectiva, de crecimiento tipo levaduriforme. A continuación, un micelio dicariótico, altamente infectivo, es formado a partir de la unión de dos esporidios, haploides, sexualmente compatibles, lo cual ocurre de la misma manera en *S. scitamineum*. Ha sido descrito que células de *U. maydis* incapaces de producir PUT fueron también incapaces de transitar a la fase dimórfica infectiva (Guevara-Olvera *et al.*, 1997) a pesar de que su crecimiento no fuera inhibido. Sin embargo, las mismas células fueron capaces de pasar a la fase dimórfica tras una adición exógena de SPD (Valdés-Santiago *et al.*, 2010). Dichos autores sugirieron que la PUT únicamente sirve de intermediario para la producción de SPD durante la transición entre ambas fases.

La separación por electroforesis capilar (CE) de las PAs producidas por teliosporas de *S. scitamineum* no tratadas con glicoproteínas HMMG revelaron la existencia de niveles moderados de PUT y SPD solubles en las fracciones interna y segregada de las células (Figura 119). Esto confirma que una cantidad controlada de estas PAs debe ser fundamental para el desarrollo del patógeno. SPD parece importante para favorecer la germinación mediante su interacción con el citoesqueleto (Figura 112) y PUT incrementa la infectividad por medio de la liberación de esporidios (Figura 109), además de servir como intermediario para la síntesis de SPD, lo cual parece ser su papel fundamental (Valdés-Santiago *et al.*, 2010). Esto implicaría, que la germinación de las teliosporas y la transición del patógeno a su forma infectiva, por analogía a lo descrito en *U. maydis*, requiere una rápida y eficiente conversión a SPD de toda la PUT producida. Si la PUT llega a ser acumulada podría transformarse en tóxica para la célula, produciendo el fallo en la germinación.

El papel de las PAs en la germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* se esquematiza en la Figura 154 y se describe brevemente a continuación. En primer lugar, la arginasa fúngica debe estimular la señal de quórum, aglutinando un alto número de células en el punto de infección. Entonces, la arginasa, internalizada, actuaría sobre la

arginina produciendo ornitina y posteriormente PUT, la cual se metabolizaría rápidamente en SPD para evitar su acumulación. Moderados niveles de SPD favorecerían la germinación de las teliosporas, por medio de su interacción

sobre los MT y el exceso de PUT (si hubiese) sería eliminado al medio. Allí favorecería la producción de esporidios sobre otras células, incrementando la virulencia del patógeno en el punto de infección.

Figura 154

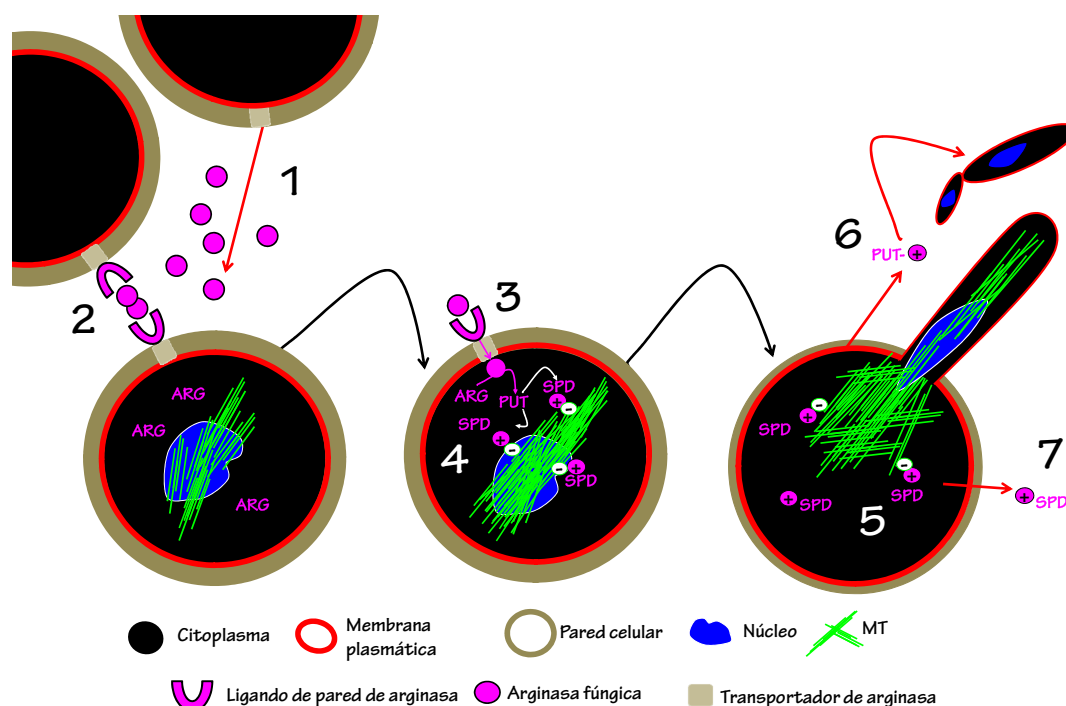


Figura 154. Producción de PAs en esporas no tratadas con HMMG durante su germinación. Liberación de arginasa por las teliosporas en los primeros estadios de germinación (1). La unión de la arginasa a su receptor en la pared de las células fúngicas conlleva su citoaglutinación y la formación del quórum (2). Internalización de la arginasa (3) y producción de PUT a partir de arginina (ARG) por acción de la arginasa (no se muestra la ornitina, molécula intermediaria para la síntesis de PUT) (4). Niveles moderados de SPD interaccionan con el citoesqueleto, estimulando su polimerización (5). El exceso de PUT es liberado, estimulando en otras células vecinas la liberación de esporidios potencialmente infectivos (6). El exceso de SPD puede ser liberado al medio (7).

Las HMMG producidas por plantas no inoculadas del cv. My 55-14 incrementan

los niveles totales de PAs en las teliosporas en relación al control, probablemente por

medio de la acción de la SCA activa contenida en las glicoproteínas, mientras que las plantas no inoculadas del cv. B 42231 no alteraron los niveles de PAs en las células fúngicas, posiblemente por contener de forma constitutiva bajos niveles de SCA activa (Figura 51). De esta

manera, la SCA activa contenida en las HMMG de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 debe ser responsable del aumento de PAs observado en las teliosporas tras la incubación con estas glicoproteínas, tal y como representa la Figura 155.

Figura 155

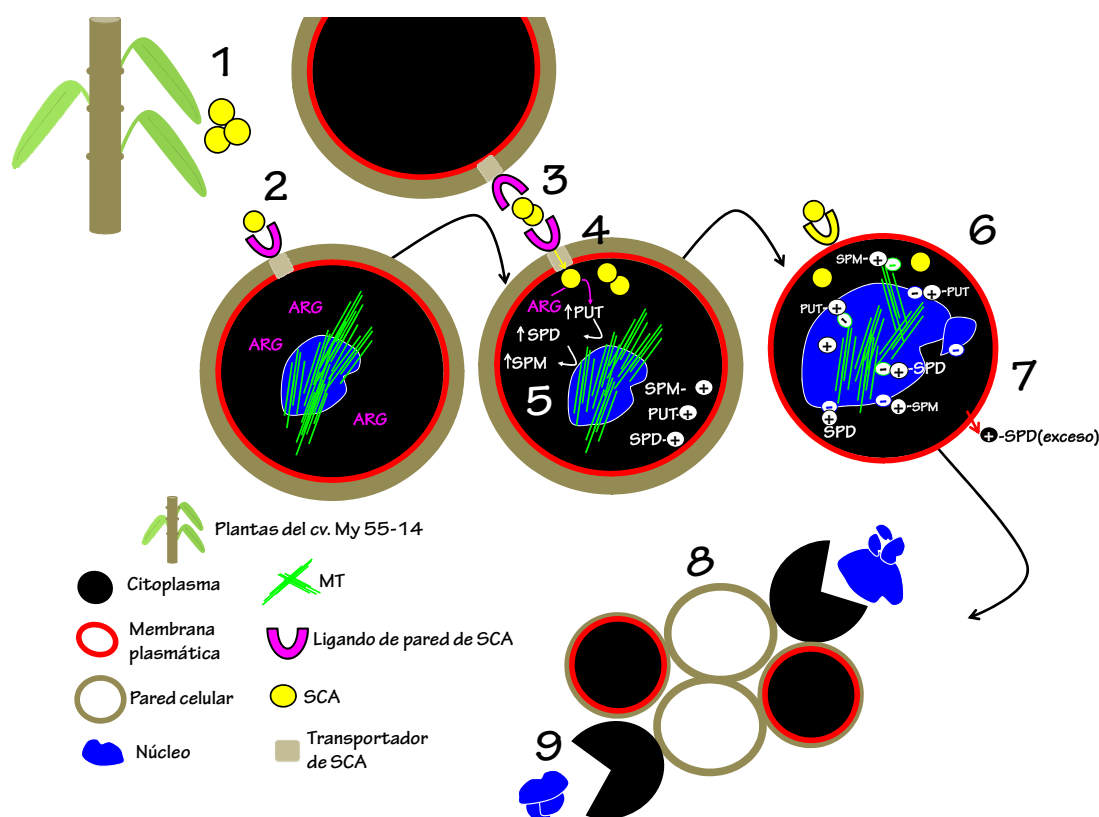


Figura 155. Producción de PAs en esporas tratadas con HMMG de plantas no inoculadas de My 55-14. Liberación de SCA por las plantas de caña de azúcar (1), unión de SCA a su ligando de pared (2), la cual estimula los procesos de citoaglutinación y falso quórum (3) e internalización de SCA (4). La SCA activa cataliza la síntesis de grandes concentraciones de PAs en el interior celular a partir de arginina (ARG) (5). El exceso de PAs es derivado hacia su conjugación con moléculas grandes, altamente cargadas negativamente, como el citoesqueleto o los ácidos nucleicos (6). Parte del exceso de PAs se elimina por secreción al medio (7). El exceso de PUT causa la liberación de protoplastos tras la rotura de las paredes celulares (8), la liberación al medio del contenido nuclear y citoplasmático (9) y la muerte celular.

Así, la actividad arginasa contenida en las glicoproteínas de defensa de My 55-14 catalizaría rápidamente la producción de ornitina, siendo ésta a su vez transformada en PUT por la enzima ODC (Walters, 1995). La acumulación de la diamina que solo a bajas concentraciones es beneficiosa, podría llegar a ser tóxica para las células si éstas no consiguieran eliminarla por medio de su secreción al medio o la transformación en SPD. El exceso de PUT podría incluso unirse a los MT inhibiendo su polimerización y favoreciendo la desorganización nuclear (Figura 155).

Por otro lado, el exceso de PUT, al no poder ser completamente transformado en SPD, podría estimular la destrucción de las paredes celulares y la liberación del contenido celular al medio, según había sido demostrado previamente (Figura 114). Así, la presencia de mayores niveles de SCA activa en las glicoproteínas del cv. My 55-14 las convierte en plantas constitutivamente más preparadas para defenderse de la infección.

Las PAs conjugadas a grandes macromoléculas fueron únicamente detectadas en las teliosporas tras la incubación con glicoproteínas de plantas no inoculadas del cv. My 55-14 (Figura 119), donde el exceso de PAs fue eliminado en forma de SPD.

El cultivar resistente prácticamente duplicó el nivel de PAs totales tras la infección a pesar de que en ese momento la actividad había desaparecido en el total de glicoproteínas de defensa, como reflejo de un patrón en el cambio de respuesta (Figura 51). Si la cantidad de arginasa activa disminuye en las plantas de la variedad resistente tras la inoculación, la excesiva producción de PAs podría ser consecuencia de una activación no controlada de la arginasa fúngica por algún componente de las HMMG. La propia arginasa contenida en el total de HMMG, inactiva, podría activarse en presencia de las teliosporas. Se propone también que el ácido salicílico (SA) que producen las teliosporas durante su germinación, según describe Fontaniella *et al.* (2002), podría estimular la síntesis de PAs en ausencia de arginasa activa por medio de la activación de la enzima ADC (ver Figura 147). Estas razones servirían para explicar el incremento de PAs observado en el interior de las células fúngicas tras su incubación con HMMG de plantas inoculadas de My 55-14. Las teliosporas tratarían de eliminar el exceso de estas moléculas secretándolas al medio (Figura 119), principalmente en forma de SPD y SPM.

Así, es interesante que las teliosporas de *S. scitamineum* son capaces de formar SPM, algo que no ocurre en las células de *U maydis* (Valdés-Santiago *et al.*, 2009). Sin embargo, las células de *S.*

scitamineum solo produjeron SPM tras su incubación con las glicoproteínas, mientras que la PA no fue producida por las teliosporas control. Se propone entonces que la aparición de SPM podría reflejar el intento de las células fúngicas de eliminar el exceso de PAs producido en presencia de HMMG de My55-14. El incremento de SPM también ha sido significativo durante la defensa de las plantas de *Nicotiana tabacum* al virus del mosaico del tabaco (Yamakawa *et al.*, 1998).

En los experimentos de Wojtasik *et al.*, (2015) con plantas de lino, la principal PA identificado fue la PUT, observando que su nivel aumentaba tras la infección por especies patógenas del género *Fusarium*. Sin embargo, resulta interesante que las PAs no alcanzaron niveles tan altos cuando la infección fue provocada por especies no patógenas. La activación de diferentes mecanismos de defensa dependiendo del nivel de virulencia del patógeno manifiestan la existencia de un reconocimiento por parte de la planta de las especies potencialmente infectivas. Se sugiere que las mismas diferencias podrían observarse entre los cvs. My 55-14 y B 42231. Las plantas del cv. My 55-14 son capaces de reconocer a *S. scitamineum* como un patógeno potencial, desencadenando una modificación en el patrón de respuesta de defensa basado, entre otros mecanismos, en un aumento de los niveles generales de PAs. Sin embargo,

las glicoproteínas de defensa producidas por B 42231 no estimulan el mismo exceso en la producción de PAs en las células fúngicas, lo cual podría sugerir que no reconoce al patógeno como tal (o tarda más en hacerlo).

Así, lo más interesante es señalar que el cv. sensible no modifica los niveles totales de PAs tras la infección (Figura 119) a pesar de que entonces las plantas susceptibles tratan de incrementar la actividad arginasa en el jugo (Figura 51). Esto podría deberse a que la SCA producida por el cv. susceptible no se une con eficacia a la pared de las teliosporas para producir citoaglutinación e inhibir la germinación (Figura 149). El hecho de que las glicoproteínas HMMG producidas por las plantas del cv. susceptible (tanto antes como después de la infección) no estimulen la producción de PAs, debe estar necesariamente relacionado con la incapacidad de las plantas de B 42231 para resistir a la infección.

6-¿Y SI LAS PROTEÍNAS DEFENSIVAS FALLAN? PRODUCCIÓN TEMPRANA DE LIGNANOS CITOTÓXICOS

La activación de mecanismos de defensa específicos tras el reconocimiento de organismos patogénicos es un proceso común en organismos multicelulares. Las

plantas superiores desarrollan sistemas adquiridos de resistencia (SAR) basados en la expresión de genes de resistencia contra patógenos (PRs), tras ser éstos reconocidos previamente por las proteínas producidas a partir de genes específicos de resistencia (R). Ambas clases de genes (R y PR) conforman el principal mecanismo contra el estrés biótico y, en ocasiones, abiótico (Pinzón *et al.* 2009).

Recientemente, se han identificado 1.460 genes en caña de azúcar asociados con la respuesta a patógenos, incluyendo genes asociados con respuesta hipersensible (HR) y SAR, además de genes R y PR (Wandeley-Nogueira *et al.* 2012). De las 16 clases de genes PR estudiados, los más abundantes están relacionados con la producción de peroxidasas, que incrementan la producción de ROS (Van Loon y Van Strien 1999), con la síntesis de β -1,3-glucanasas (Ebel y Cosio 1994), y con la liberación de una proteína similar a taumatina, que permeabiliza las membranas fúngicas (Vigers *et al.* 1991).

También se ha demostrado cómo la resistencia de la caña de azúcar a las infecciones depende en gran medida de la regulación de los mecanismos implicados en la síntesis de lignina (de Armas *et al.*, 2007; Santiago *et al.*, 2009). También ha sido descrito cómo la producción de glicoproteínas confiere resistencia a las

plantas de caña de azúcar ante la infección por *S. scitamineum* (Legaz *et al.*, 2011; Millanes *et al.*, 2005). En este trabajo y en relación a estas últimas, se ha demostrado cómo HMMG estimulan la quimioatracción y la citoaglutinación temprana de las células del patógeno, lo cual logra evitar su germinación. Pero además, se realizó un análisis acerca de su composición mediante PAGE-SDS y espectrometría de masas (ESI-Q-Q-TOF), para entender mejor dónde radica su papel defensivo.

Tras la separación electroforética por PAGE-SDS de las glicoproteínas producidas por plantas no inoculadas de los cvs. My 55-14 y B 42231, se revelaron tres bandas en el cv. sensible y seis en el resistente para la fracción MMMG (Figura 120 A) y dos bandas para el cv. susceptible y cuatro para el resistente para las glicoproteínas HMMG (Figura 120 B). Un análisis previo por CE de ambas fracciones había revelado que la fracción MMMG contiene dos componentes catiónicos y dos aniónicos, mientras que únicamente un componente catiónico y cuatro proteínas aniónicas fueron separadas en la fracción HMMG (Legaz *et al.* 1998b). Éstas podrían ser consideradas como factores de resistencia, ya que incrementan tras la infección con el patógeno en el cv. resistente mientras que decrecen en el susceptible (Martínez *et al.* 2000). El análisis por ESI-Q-Q-TOF de las bandas resultantes tras la separación por

PAGE-SDS mostró que las proteínas DIR o similares a DIR eran las proteínas más abundantes en las muestras analizadas (Tabla X).

Los análisis de expresión mediante qRT-PCR mostraron que los niveles transccripcionales de *SofCAD* en tejido meristemático de plantas no inoculadas (C) eran más altos en el cv. resistente que en el susceptible (Figura 121). La inoculación con esporidios conjugantes produjo una disminución en los niveles de *SofCAD* en ambos cvs. en relación a las plantas no inoculadas en cada caso. Sin embargo, la represión fue siempre más intensa en plantas resistentes. La expresión de *SofCAD* en los meristemas de plantas de los cvs. My 55-14 y B 42231 recogidas 3 y 6 h post-inoculación, respectivamente, era un poco superior a las mismas tras la inyección con agua. Los experimentos realizados por Santiago *et al.* (2012) en plantas de los mismos cvs. demostraron que las actividades CAD y sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD) estaban ligadas a la resistencia de las plantas de caña al patógeno *S. scitamineum* por medio de la síntesis de ligninas. En concreto, estos autores demostraron que la actividad SAD aumenta en las plantas del cv. resistente tras la inoculación.

Casu *et al.*, (2007) identificaron transcritos para la enzima CAD y las

proteínas DIR que son diferencialmente expresados en los tallos de caña de azúcar. Mientras que CAD es requerida para la biosíntesis de monolignoles, las proteínas DIR son expresadas en tallos maduros permitiendo la formación tanto de lignina como de lignanos (Casu *et al.* 2004). La modificación en la expresión de estos genes en las plantas de caña de azúcar podría implicar un redireccionamiento del metabolismo para elaborar una respuesta adecuada de defensa (Smith y Stitt 2007). Se propone así que la resistencia de las plantas de caña de azúcar en relación a la expresión de *SofDIR* podría ir dirigida hacia la producción de lignina (reforzando la formación de la barrera mecánica) o a la síntesis de lignanos, con efecto citotóxico sobre las células de *S. scitamineum*.

Justamente, los resultados más sorprendentes fueron los encontrados en relación a la expresión de *SofDIR* en las plantas de caña de azúcar. Los niveles iniciales de la expresión de este gen (en plantas no inoculadas) fueron mayores en el cv. resistente en comparación con el susceptible, tanto en tejido meristemático como en tejido foliar. Sin embargo, la inoculación con el patógeno produjo respuestas diferentes en función del cv. analizado. Mientras que los niveles transccripcionales de *SofDIR* disminuían en el tejido meristemático y foliar de las plantas del cv. My 55-14, resistentes al carbón, los

misimos incrementaban en las plantas del cv. B 42231, sensibles al patógeno. Las plantas de ambos cvs. sí mostraron el mismo patrón de respuesta tras la inyección con agua. A las 6 h se observó una expresión incrementada de *SofDIR* en el punto de inoculación (en el tallo) en las plantas de ambos cvs. Se propone que el daño únicamente mecánico (no patogénico) conllevaría un aumento local de la expresión de DIR que derivaría en un incremento de la lignificación en el lugar de la herida.

La lignificación incrementa generalmente en los organismos vegetales como consecuencia de una situación de estrés. Por ejemplo, el estrés hídrico y la formación de heridas estimulan la síntesis de lignina en *Daucus carota* (Becerra-Moreno *et al.* 2015). De la misma manera, en plantas de pimiento la deposición de lignina es inducida localmente en las hojas tras la producción de heridas, al mismo tiempo que se observa una reducción de la síntesis y deposición a nivel sistémico. Esto sugiere que todas las defensas confluyen en la herida, donde en ese momento son necesarias, mientras que disminuyen en el resto de la planta (García *et al.* 2015). Este hecho explicaría por qué la expresión de *SofDIR* incrementó tras la inyección con agua en el punto de inoculación a la vez que disminuía en áreas más alejadas, como en las hojas. Sin embargo, un incremento de la expresión podía ser también observado en

las secciones basales de las hojas del cv. resistente a las 6 h de inoculación, siendo probable que la transmisión de la señal hubiese viajado más rápido en las plantas del cv. resistente, de manera que a las 6 h ya hubiese alcanzado regiones adyacentes al tejido meristemático.

Se han descrito diferencias relacionadas con la velocidad de transmisión de una misma señal entre variedades resistentes y no resistentes de plantas a un patógeno. Por ejemplo, niveles de óxido nítrico (NO) están relacionados con la velocidad de transmisión de la respuesta hipersensible en plantas de pimiento tras la infección por *Phytophthora capsici*. La producción de NO y la actividad de la NO sintasa (NOS) fueron significativamente mayores en los tejidos de plantas resistentes (Requena *et al.* 2005). Esta señalización podría incrementar también en plantas de My 55-14 si se confirmara la hipótesis de que la disminución de actividad arginasa tras la inoculación conlleva una mayor producción de NO por parte de la enzima NOS.

Por otro lado, los resultados muestran que la inoculación con el patógeno (daño mecánico + infección) estimuló una respuesta diferente en las plantas en relación a lo observado cuando eran únicamente inyectadas con agua (daño mecánico). Esta respuesta diferencial, que

no fue observada en el cv. susceptible, debía haber sido desencadenada por la presencia del patógeno y responsable de la resistencia de las plantas del cv. My 55-14.

Se ha comprobado que existe una respuesta diferencial de las plantas ante daños producidos por agentes bióticos o abióticos (Rajendran *et al.* 2014). Además, se ha demostrado que las plantas reaccionan de manera diferente cuando se enfrentan a algún tipo de estrés que aparece individualmente o de manera simultánea a otro. Esto significa que la reacción de una planta ante una situación que englobe al mismo tiempo diferentes formas de estrés no puede ser fácilmente predecible (Atkinson y Urwin, 2012; Rejeb *et al.* 2014).

Se propone entonces que un mecanismo de defensa específico debe desencadenarse en las plantas del cv. resistente tras la infección. La expresión de proteínas DIR que favorecen la síntesis de lignina podría no ser una prioridad a corto plazo para las plantas del cv. resistente donde la expresión de *SofDIR* en el tejido meristemático disminuye ya desde las 3 h post-inoculación. Este patrón de respuesta, que no fue observado en las plantas del cv. B 42231, fue transmitido a las áreas adyacentes a los meristemas. Esto sugiere que las plantas resistentes son capaces de detectar la presencia del patógeno en sus

tejidos y desencadenar una respuesta diferente a la desencadenada tras la inyección con agua. El cv. susceptible, parece detectar en ambos casos la presencia de una herida, pero no la entrada del patógeno.

La reducción tan significativa encontrada en los niveles de expresión de las proteínas DIR en las plantas del cv. My 55-14 tras la inoculación con el patógeno en relación a las plantas no inoculadas hizo sospechar que ésta podría venir acompañada de un incremento en la cantidad de lignanos con efecto citotóxico en los tejidos infectados. Así, se realizó una valoración del contenido de lignanos en las plantas de ambos cvs. antes y después de su inoculación, con el fin de establecer una relación con los niveles de expresión de las proteínas DIR.

La disminución en la expresión de proteínas DIR dispara la síntesis de lignanos

La separación por CE de los extractos de lignanos obtenidos a partir de tejido meristemático de las plantas de ambos cvs. mostraron un incremento general en los niveles de pinoresinol y secoisolariciresinol en las plantas de My 55-14 tras la inoculación con el patógeno, los cuales, por el contrario, disminuían en el cv. susceptible. Esto sugirió que la presencia del patógeno podría estimular, por medio de la disminución de la expresión de las proteínas

DIR, un incremento de la producción de lignanos en el punto de inoculación en las plantas de My 55-14 con efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno.

El efecto citotóxico de los lignanos ha sido demostrado sobre otros organismos fúngicos. Por ejemplo, se ha comprobado que tanto el pinoresinol como el secoisolariciresinol inhiben el crecimiento radial y la producción de tricotecenos en el hongo *Fusarium graminearum* (Kulik *et al.*, 2014), de igual manera que el (+)-pinoresinol aislado de *Sambucus williamsii* manifiesta propiedades antifúngicas sobre *Candida albicans*, *Trichosporon beigelii* y *Malassezia furfur* (Hwang *et al.*, 2010).

Debido a que los niveles de secoisolariciresinol y pinoresinol incrementaban en las plantas del cv. resistente tras su inoculación, se analizó el efecto que ambos lignanos comerciales ejercían sobre el desarrollo de las células fúngicas.

Los ensayos de germinación y formación de micelio dicariótico en presencia de concentraciones crecientes de pinoresinol y secoisolariciresinol (Figuras 128 y 129) no fueron concluyentes acerca del efecto de ambos lignanos sobre el desarrollo de las células de *S. scitamineum*. La aparición del micelio se vio afectada negativamente por la presencia del pinoresinol y por las bajas concentraciones

de secoisolariciresinol. Sin embargo, las altas concentraciones de pinoresinol y secoisolariciresinol (sobre todo de este último) parecían favorecer el desarrollo del patógeno. Sorprendió que las alteraciones morfológicas encontradas en muchos de los esporidios incubados en presencia de los lignanos no estuvieran relacionadas directamente con una inhibición de su crecimiento ni de su conjugación (Figuras 130, 131).

Ambos lignanos provocaron el alisamiento de las colonias de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -) cuando éstos se encontraban a una concentración inicial de $2,6 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ (Figura 132). La variación fenotípica observada en las colonias podría indicar un cambio en la virulencia del patógeno, como ocurre durante el crecimiento de otros organismos (Rashid *et al.*, 2003; Yang, 2003). Además, se sugiere que este alisamiento podría estar relacionado con la disminución en el contenido proteico detectado en las colonias de *S. scitamineum* cuando éstas crecían en un medio conteniendo pinoresinol (Figura 139). La misma tendencia de alisamiento de las colonias fue observado cuando se incrementó la concentración inicial de pinoresinol al mismo tiempo que se disminuía la concentración inicial de inóculo (Figuras 135, 136, 137 y 138), pero en ningún caso se evitó el crecimiento del patógeno.

Sospechando que podría ser necesaria la presencia de otros lignanos en el medio, además de secoisolariciresinol y pinoresinol, para desencadenar una acción eficaz contra el desarrollo de las células de *S. scitamineum*, se realizaron ensayos de crecimiento de esporidios aislados (+) y compatibles (+ y -) utilizando una mezcla de cinco lignanos comerciales (pinoresinol, matairesinol, lariciresinol, isolariciresinol y secoisolariciresinol). Sin embargo, tampoco así se obtuvieron resultados definitivos acerca del efecto citotóxico de los lignanos sobre las células del patógeno. La mezcla utilizada produjo evidentes alteraciones nucleares en muchas de las células (Figura 141), sorprendiendo de nuevo que, incluso en esas condiciones, ni el crecimiento ni la conjugación de las colonias quedara macroscópicamente bloqueada (Figura 140).

Únicamente los extractos de lignanos obtenidos de las plantas de caña de azúcar provocaron un efecto inhibitorio evidente sobre el desarrollo de las células fúngicas. Aquellos producidos por plantas control e inoculadas del cv. resistente bloquearon el crecimiento de las colonias de esporidios aislados (+) de *S. scitamineum* (Figura 144 B). La concentración inicial de inóculo fue definitiva, ya que el crecimiento de la colonia se inhibió cuando ésta era de $2,6 \cdot 10^4$ células·mL⁻¹ (Figura 144 B), pero no cuando era de $2,6 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ (Figura 142).

Por otro lado, la germinación de las teliosporas disminuyó tras su exposición a los diferentes extractos, en relación a las células no tratadas. Únicamente en el caso de la incubación en presencia de los extractos obtenidos de plantas inoculadas del cv. sensible (Figura 144 B) la germinación de las células fue similar al control.

Se ha comprobado que los lignanos extraídos de *Larrea tridentata* también reducen el diámetro de las colonias de los patógenos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Vargas-Arispuro *et al.*, 2005) y que su acción fungicida radica en el bloqueo de la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa fúngica (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009). También los efectos citotóxicos del (+)-pinoresinol (Hwang *et al.*, 2010) y el lariciresinol (Hwang *et al.*, 2011) están relacionado con su acción degradativa sobre la membrana plasmática del hongo, posiblemente por su relación con peroxidasas y lacasas.

Por otro lado, se ha descrito el efecto desorganizador de algunos lignanos sobre el citoesqueleto de actina (Moon *et al.*, 2008), de la misma manera que se ha comprobado que las propiedades antivirales de la podofilotoxina, lignano contenido en *Podophyllum peltatum*, radican en la capacidad del lignano para bloquear la polimerización del citoesqueleto mediante

su unión a la tubulina (Canel *et al.*, 2000). De igual manera, se propone en este trabajo que el efecto inhibitorio de los lignanos sobre la germinación podría derivar de su acción sobre la organización del citoesqueleto en las teliosporas de *S. scitamineum*, la cual se ha descrito previamente como fundamental para desencadenar importantes procesos como el crecimiento del tubo germinativo, la migración nuclear y la liberación de los esporidios conjugantes durante la germinación de las teliosporas.

En cualquier caso, el efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las células de *S. scitamineum* fue desencadenado por la presencia de los extractos totales obtenidos a partir del tejido vegetal, y no de los compuestos comerciales. En la literatura encontramos algunos ejemplos en los cuales el efecto de un compuesto depende de si éste se encuentra formando parte de un extracto o aislado, separado del resto de componentes que le acompañan en condiciones naturales. Esto ocurre por ejemplo en el caso de los ácidos protocetrárico y fumarprotocetrárico, los cuales, aunque se han descrito como responsables de los efectos alelopáticos causados por *Cladonia verticillaris* sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa*, ejercen su acción únicamente si están contenidos en los extractos orgánicos obtenidos del liquen pero no

cuando se ensayan como componentes purificados (Tigre *et al.*, 2012).

Einhellig y Rasmussen (1979) describen que la presencia de algunos fenoles, incluso en cantidades mínimas, resulta totalmente relevante para que, en una mezcla, diferentes componentes de la misma actúen sinérgicamente. Por ello, parece lógico pensar que los extractos de lignanos obtenidos a partir de las plantas de caña de azúcar deben contener otras sustancias, de estructura y polaridad semejante a los lignanos, imprescindibles para que la mezcla ejerza un efecto citotóxico definitivo sobre el desarrollo de las células de *S. scitamineum*. Una posible explicación sería que la caña de azúcar produzca lignanos con actividad biológica distintos a los cinco comerciales utilizados (siringaresinol o medioresinol, por ejemplo) u otros fenoles coadyuvantes, como la naringenina y otros flavonoides, cuya existencia se ha demostrado en jugos de caña de azúcar (Legaz *et al.*, 1998c).

Sin embargo, las variaciones en los niveles de secoisolariciresinol y pinoresinol podrían desempeñar un papel predominante en la defensa de la planta ante la infección, aun bajo la condición de actuar en sinergia con otros metabolitos. La cantidad de pinoresinol en el tejido meristemático de las plantas del cv. resistente (My 55-14) disminuyó tras la inyección de las plantas

con agua, pero aumentó hasta cinco veces tras la inoculación de las plantas con el patógeno. Al mismo tiempo, aunque las plantas no inoculadas mostraban ausencia de secoisolariciresinol, la cantidad de este lignano aumentó tanto tras la inyección con agua como tras la inoculación con el patógeno, sobre todo en este último caso (Figura 144 C).

La relación de estos resultados con el efecto de los extractos sobre la germinación (144 B) y el desarrollo de las colonias de esporidios aislados (+ y -) (Figura 144 A) sugirieron que el pinoresinol podría estar implicado en la inhibición del crecimiento de la colonia y el secoisolariciresinol en el bloqueo de la germinación. Según esta hipótesis, la ausencia de secoisolariciresinol acompañada de niveles basales de pinoresinol ($20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido) en My 55-14 habría permitido la germinación de las teliosporas pero no el desarrollo de las colonias. La desaparición de pinoresinol en el tejido meristemático de plantas inyectadas con agua (My 55-14 A), unida a la aparición de secoisolariciresinol ($\approx 2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido), habría provocado el efecto contrario, mientras que una alta concentración de ambos lignanos sería responsable del bloqueo de ambos procesos en las plantas infectadas.

Durante la interacción compatible entre *Fusarium oxysporum* y *Linum usitatissimum* se ha comprobado que la presencia del patógeno bloquea la producción de secoisolariciresinol y algunos neolignanos por parte de la planta, al mismo tiempo que se observa un aumento de la expresión del gen que codifica para la enzima pinoresinol-lariciresinol reductasa (PLR) (Hano *et al.*, 2008). Estos autores sugieren que los niveles de lignanos disminuyen en las plantas de lino tras la infección para favorecer la síntesis de lignina, de igual manera que debe estar ocurriendo en las plantas inoculadas de caña de azúcar del cv. susceptible, en las que se observa una desaparición en la producción de secoisolariciresinol y pinoresinol.

La ausencia de este último en el tejido meristemático de las plantas del cv. susceptible podría haber derivado en la incapacidad de los extractos para detener el crecimiento de las colonias (Figura 144 A). Sin embargo, la presencia de secoisolariciresinol en las plantas inyectadas con agua (respuesta a una agresión física) y en aquellas inoculadas con el patógeno (≈ 10 y $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido, respectivamente) habrían logrado bloquear su germinación (Figura 144 B). De igual manera, la ausencia de secoisolariciresinol en los extractos obtenidos a partir del tejido meristemático de plantas inoculadas favorecería la germinación de las teliosporas

de *S. scitamineum* (Figura 144 B). Este hecho, unido a una facilitación del crecimiento de las colonias de esporidios aislados (+ y -) (Figura 144 A) por la ausencia de pinoresinol, serían condiciones definitivas para el establecimiento de una infección en las plantas inoculadas de la variedad susceptible.

7-VISIÓN GLOBAL DEL PROCESO DE DEFENSA EN LOS PRIMEROS ESTADIOS

Finalmente, una visión global del proceso desencadenado por las glicoproteínas HMMG durante la interacción entre la caña de azúcar y *S. scitamineum* debe ser considerada y se esquematiza en la Figura 156.

En primer lugar, se ha confirmado que las células fúngicas producen una señal de quórum que estimula la quimioatracción y la citoaglutinación de un número tal de teliosporas que garantice la infección. La arginasa fúngica resulta ser la responsable de la agregación de las células y de estimular la germinación del grupo, probablemente por medio de un incremento moderado de los niveles de PAs (Figura 156 B).

Por otro lado, los resultados obtenidos confirman la existencia de un

citoesqueleto organizado en las células de *S. scitamineum*, implicado en los procesos de germinación y movimiento. La polimerización de la actina es un proceso necesario para la formación del tubo germinativo y los MT parecen ser fundamentales para la translocación del núcleo durante la germinación. Por otro lado, las invaginaciones observadas durante el desplazamiento celular indican que éste tiene lugar por medio de continuos episodios de polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina, anclado a la membrana plasmática en uno de sus polos celulares. A su vez, la actina y los MT interaccionan, participando conjuntamente en el establecimiento de la germinación y el movimiento.

Se ha demostrado que las HMMG producidas por el cv. My 55-14 también provocan una fuerte estimulación de la quimioatracción y la citoaglutinación de las células, acciones que derivan en el bloqueo de la germinación y en la destrucción de las paredes celulares por acción de las enzimas degradativas contenidas en las glicoproteínas. El efecto desencadenado por las glicoproteínas es considerado una señal de falso quórum, ya que la SCA contenida en las HMMG conlleva irremediablemente a la inhibición de la germinación de las teliosporas (Figura 156 A).

Figura 156

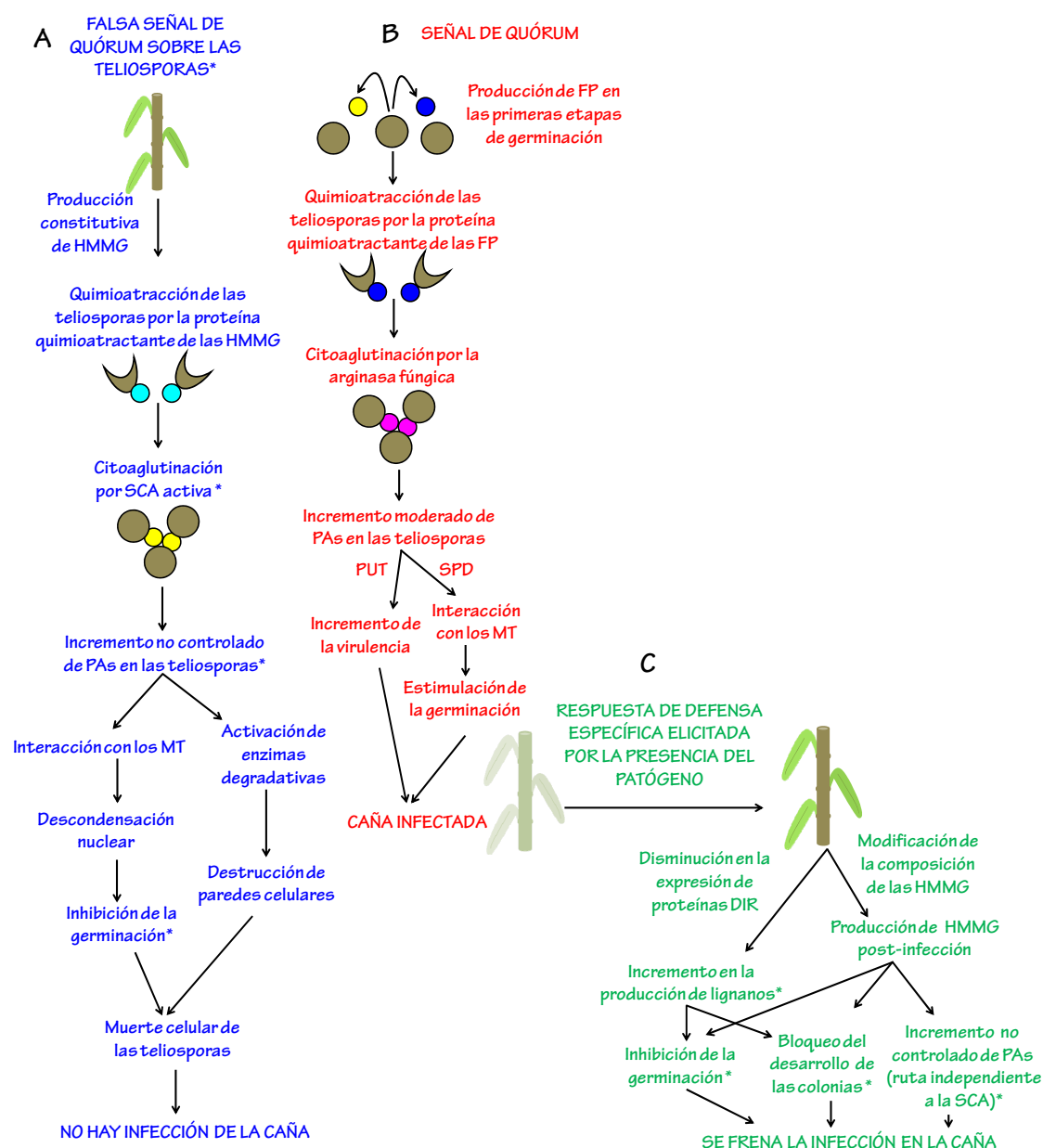


Figura 156. Esquema del proceso de interacción entre las plantas del cv. My 55-14 y *S. scitamineum* durante los primeros estadios de la infección, por medio de la producción de HMMG. En azul, los eventos que se suceden durante el establecimiento de la señal de falso quórum (A). En rojo, los procesos que se desencadenan si las teliosporas comienzan a germinar y producen la señal de quórum que establece la infección (B). En verde, la elicitación de una respuesta específica de defensa por parte de las plantas, tras la detección de la presencia del patógeno (C). Representando (🌿) las plantas de caña de azúcar del cv. My 55-14, (●) las teliosporas del carbón, (●) la proteína quimioatractante en las HMMG, (●) la SCA, (●) la proteína quimioatractante en las FP y (●) la arginasa fúngica. Aquellos sucesos que se ha comprobado que no se desencadenan de igual manera por las HMMG de plantas del cv. susceptible y que, por tanto, podrían ser clave en la resistencia de My 55-14 son indicados con asterisco (*).

Las glicoproteínas de caña median su efecto defensivo a través de la polimerización y la despolimerización del citoesqueleto de las células fúngicas. Así, las HMMG estimulan la organización del citoesqueleto para inducir el movimiento de las teliosporas pero lo desorganizan para evitar su germinación. El bloqueo de la germinación se debe a una producción incrementada de PAs por acción de la SCA. Los MT, despolimerizados por efecto del exceso de PAs, fallan en su función de mantener al núcleo condensado durante la migración celular, de manera que su translocación no tiene lugar y la germinación de las teliosporas no se produce, como se propone en la Figura 156A.

La arginasa fúngica y la SCA compiten por su mismo ligando en la pared de las teliosporas, sobre el cual la primera enzima tiene más afinidad. Es por ello que, para lograr una defensa eficaz, la SCA debe unirse al ligando de pared cuando aún la arginasa fúngica no se haya producido, indicando que la producción constitutiva de SCA activa podría desempeñar un papel fundamental en la defensa temprana de la planta a la infección. Ésta podría ser necesaria para a) inducir un proceso de citoaglutinación eficaz, b) evitar la síntesis de arginasa fúngica y c) bloquear la germinación de las teliosporas.

Se propone por otro lado que, las glicoproteínas procedentes de las plantas del cv. susceptible, conteniendo SCA inactiva, desencadenan una respuesta de defensa ineficaz debido a que 1) ejercen sobre las teliosporas un menor efecto quimioatractante, 2) no estimulan su aglutinación y 3) inhiben su germinación únicamente a concentraciones moderadas de SCA.

Sin embargo, incluso si las teliosporas consiguen germinar y la infección se produce, las plantas resistentes podrían ser capaces de inducir mecanismos de defensa más específicos contra el patógeno (Figura 156 C), posiblemente por medio de la señalización del ácido salicílico (SA). Por ejemplo, la disminución en la expresión de proteínas DIR tras la infección en las plantas del cv. resistente parece venir acompañada de un incremento en la producción de lignanos con efecto citotóxico sobre el desarrollo del patógeno en crecimiento, entre los cuales el secoisolariciresinol y el pinoresinol parecen desempeñar un papel fundamental.

Los resultados de este trabajo demuestran cómo la existencia de mecanismos tempranos de resistencia en las plantas de caña de azúcar podría ser clave para frenar la infección por el patógeno *S. scitamineum*. Las plantas resistentes podrían serlo porque consiguen frenar el

desarrollo del patógeno en estadios muy tempranos de su crecimiento, mientras que una defensa desencadenada demasiado tarde por parte las plantas susceptibles sería responsable del establecimiento en éstas de la enfermedad del carbón.

Conclusiones

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral son enumeradas a continuación:

1. Las plantas de caña de azúcar del cv. My 55-14, resistentes a la enfermedad del carbón, producen glicoproteínas de defensa (HMMG) contra el patógeno *Sporisorium scitamineum* que desencadenan la quimioatracción y la citoaglutinación de las teliosporas. La agregación de un gran número de células fúngicas en una pequeña zona de contacto con las glicoproteínas confiere resistencia, ya que la actividad degradativa contenida en el conjunto de estas glicoproteínas (β -1,3 y β -1,4-glucanasa y quitinasa) puede actuar hidrolizando las paredes de muchas teliosporas simultáneamente.
2. La proteína arginasa (SCA), contenida en la fracción glicoproteica HMMG y semi-purificada del cv. My 55-14 en conformación activa, es el agente citoaglutinante, el cual además inhibe la germinación de las células fúngicas. El agente quimioattractante, distinto de la arginasa fúngica, aún no ha sido caracterizado.
3. Las teliosporas producen durante su germinación un conjunto de proteínas (FP) de composición muy similar a la fracción glicoproteica HMMG de las plantas del cv. My 55-14. Estas proteínas también estimulan la quimioatracción y la citoaglutinación de las teliosporas, pero, contrariamente a HMMG, aceleran su germinación por acción de la arginasa fúngica activa (AFA). Así, las proteínas segregadas por las teliosporas son consideradas una señal de quórum, mientras que las glicoproteínas de defensa constituirían una señal de falso quórum al bloquear el desarrollo del patógeno.
4. La arginasa fúngica (AFA) y la arginasa de la caña de azúcar (SCA) compiten por el mismo ligando de pared presente en la superficie de las teliosporas, por el cual la enzima del hongo tiene más afinidad. Por ello, la resistencia a la infección podría estar ligada a una producción constitutiva de arginasa activa por parte de la planta, de manera que ésta pudiera unirse a su ligando de pared antes de que la arginasa fúngica fuera producida en las primeras etapas de la germinación.
5. Las teliosporas de *S. scitamineum* poseen un citoesqueleto organizado implicado en importantes procesos, como son la germinación y el movimiento. La polimerización de la actina es necesaria para la elongación del tubo germinativo y los microtúbulos parecen ser fundamentales para la translocación del núcleo durante la germinación. Por otro lado, las invaginaciones observadas durante el desplazamiento celular indican que éste tiene lugar por medio de continuos episodios de polimerización y despolimerización del citoesqueleto de

actina, en colaboración con la miosina, y no debido a la existencia de estructuras móviles externas. A su vez, la actina y los microtúbulos interaccionan, participando conjuntamente en el establecimiento de la polaridad celular.

6. Las glicoproteínas HMMG de caña de azúcar del cv. My 55-14 estimulan la organización del citoesqueleto de actina para inducir el movimiento de las teliosporas hacia los puntos de citoaglutinación, pero lo desorganizan para evitar su germinación, haciendo que las células aglutinadas pierdan su polarización.

7. El bloqueo de la germinación se debe a una producción incrementada de poliaminas por acción de la actividad arginasa. Una despolimerización de los microtúbulos por un exceso de poliaminas impide la migración del núcleo hacia el poro germinativo, de manera que su translocación hacia la hifa emergente no tiene lugar y la germinación del patógeno falla.

8. La ausencia de producción constitutiva de arginasa activa por parte de las plantas de caña de azúcar del cv. B 42231 podría ser responsable de la susceptibilidad de estas plantas a la infección al no desencadenarse eficazmente algunos de los mecanismos tempranos de defensa que confieren resistencia, como son la citoaglutinación o el incremento de la concentración de poliaminas que bloquea la germinación de las teliosporas.

9. La disminución en los niveles de actividad arginasa en las glicoproteínas HMMG de caña de azúcar producidas por el cv. My 55-14 tras la infección podría reflejar una modificación en la estrategia defensiva de las plantas, las cuales tratarían de promover una respuesta más específica ante la presencia del patógeno.

10. La respuesta del cv. resistente, My 55-14, a la infección, consiste en una disminución de los niveles de expresión de los genes que codifican para proteínas dirigentes. Dicha disminución viene acompañada de un incremento en la producción de los lignanos pinoresinol y secoisolariciresinol, los cuales parecen desempeñar un papel relevante en la inhibición del crecimiento de las colonias y la germinación de la teliosporas, respectivamente.

Bibliografía

- Abramovitch, R., Anderson, J., Martin, G. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(8): 601-611.
- Adams D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150 (7): 2029-2035.
- Alexander, K.C., Ramakrishnan, K., 1980. Infection of the bud, establishment in the host and production of whips in sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) of sugarcane. *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologist* 17: 1452-1455.
- Alarcón, B., Santiago, R., de Armas, R., Sánchez-Elordi, E., Vicente, C., Legaz, M.E. 2016. An elicitor isolated from *Sporisorium scitamineum* multiplies xylem bridges between vascular neighboring bundles in sugarcane leaves. *Research & Reviews in Biosciences*. Enviado.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. Characteristics of fungi. En: *Introductory Mycology* 4a ed. (pp. 25-56). New York, USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Andreis H.J. 1981. Viability of sugarcane smut spores in a Florida organic soil at three moisture levels. *Sugar Journal* 42: 21-22.
- Annesley S.J., Fisher P.R. 2009. *Dictyostelium discoideum*-a model for many reasons. *Molecular and Cellular Biochemistry* 329: 73-91.
- Apodaca, G., Gallo, L.I., Bryant, D.M. 2012. Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nature Cell Biology* 14 (2): 1235-1243.
- Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M. 1997. Selective and rapid determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia* 46 (3-4): 170-176.
- De Armas R., Legaz M.E., Martínez M., Medina I., Rodríguez C.W., Vicente C. 1989. Composition of some soluble carbohydrate fractions from sugarcane juice. En: *Proceeding XX Congress ISSCT* (pp. 625-633). San Paulo, Brasil: Oct. 12-21.
- De Armas, R., Santiago, R., Legaz, M.E., Vicente, C. 2007. Levels of phenolic compounds and enzyme activity can be used to screen for resistance of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *Australasian Plant Pathology* 36 (1): 32-38.
- Artschwager, E. 1951. The role of the ligule in sugarcane taxonomy. *American Journal of Botany* 38: 144-146.
- De Ascensao, A.R.F.D.C., Dubery, I.A. 2000. Panama disease: Cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race four. *Phytopathology* 90: 1173-1180.
- Åström, H., Sorri, O., Raudaskoski, M. 1995. Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell

- in tobacco pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* 8 (2): 61-69.
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63 (10): 3523-3543.
- Bachewich, C., Heath, I.B. 1998. Radial F-actin arrays precede new hypha formation in *Saprolegnia*: implications for establishing polar growth and regulating tip morphogenesis. *Journal of Cell Science* 111: 2005-2016.
- Bakerspigel, A. 1957. The structure and mode of division of the nuclei in the yeast cells and mycelium of *blastomyces dermatitis*. *Canadian Journal of Microbiology* 3 (6): 923-936.
- Baluška, F., Barlow, P.W. 1993. The role of the microtubular cytoskeleton in determining nuclear chromatin structure and passage of maize root cells through the cell cycle. *European Journal of Cell Biology* 61: 160-167.
- Baluška, F., Jasik, J., Edelman, H.G., Salajová, T., Volkmann, D. 2001. Latrunculina B-induced plant dwarfism: plant cell elongation is F-actin dependent. *Developmental Biology* 231: 113-124.
- Baluška, F., Parker, J.S., Barlow, P.W. 1992. Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cell Science* 103: 191-200.
- Baluška, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Samaj, L., Chua, N.H., Barlow, P.W., Volkmann, D. 2000. Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology* 227: 618-632.
- Banuett F., Herskowitz I. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122: 2965-2976.
- Banuett, F., Herskowitz, I. 2002. Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* 37 (2): 149-170.
- Barnabas, E.L., Ashwin, N.M.R., Kaverinathan, K., Trentin, A.R., Pivato, M., Sundar, A.R., Malathi, P., Viswanathan, R., Rosana, O.B., Neethukrishna, K., Carletti, P., Arrigoni, G., Masi, A., Agrawal, G.K., Rakwal, R. 2016. Proteomic analysis of a compatible interaction between sugarcane and *Sporisorium scitamineum*. *Proteomics* 16: 1111-1122.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E. 2015. The cell biology of lignification in

- higher plants. *Annals of Botany* 115 (7): 1053-1074.
- Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2: 582-587.
- Bate, N.J., Orr, J., Ni, W., Meroni, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Elkind, Y. 1994. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7608-7612.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., Feldbrugge, M. 2012. Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of Cell Sciences* 125: 2740-2752.
- Becerra-Moreno, A., Redondo-Gil, M., Benavides, J., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D.A. 2015. Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Frontiers in Plant Sciences* 6: 837.
- Becker, J.W., Reeke, G.N., Wang, J.L., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. 1975. The covalent and three dimensional structure of Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* 250:1513-1524.
- Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 1 (7): 233-240.
- Benhamou, N. 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: a comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* 94: 693-705.
- Berepiki, A., Lochius, A., Read, N.D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature Reviews Microbiology* 9: 876-887.
- Bergamin, A., Amorim, L., Cardoso, C.O.N., da Silva, W.M., Sanguino, A., Ricci, A., Coelho, J.A. 1989. Epidemiology of sugarcane smut in Brazil. *Sugarcane* 2: 211-216.
- Berger, C.E., Fagnant, P.M., Heizmann, S., Trybus, K.M., Geeves, M.A. 2001. ADP binding induces an asymmetry between the heads of unphosphorylated myosin. *Journal of Biological Chemistry* 276: 23240-23245.
- Bock K.R. 1964. Studies on sugar-cane smut *Ustilago scitaminea* in Kenya. *Transactions of the British Mycological Society* 47: 403-417.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.

- Bomati, E.K., Noel, J.P. 2005. Structural and kinetic basis for substrate selectivity in *Populus tremuloides* sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 17: 1598-1611.
- Bonawitz, N.D., Chapple, C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual review of genetics* 44: 337-363.
- Bosgraaf, L., van Haastert, P.J. 2006. The regulation of myosin II in *Dictyostelium*. *European Journal of Cell Biology* 85 (9): 969-979.
- Boudet, A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68 (22): 2722-2735.
- Brand, A., Gow, N.A.R. 2012. Tropic orientation responses of pathogenic fungi. En: J. Pérez- Martín, A. Di Pietro (eds.). *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi* (pp. 21-41). Berlin, Alemania: Springer Verlag.
- Brauc, S., De Vooght, E., Claeys, M., Geuns, J.M.C., Höfte, M., Angenon, G. 2012. Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defence responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Biology* 14 (s1): 39-45.
- Braunsdorf C., Mailänder-Sánchez D., Schaller M. 2016. Fungal sensing of host environment. *Cell Microbiology* 18: 1188-1200.
- Briceño, A., Muñoz, P., Brito, P., Huenchuguala, S., Segura-Aguilar, J., Paris, I.B. 2015. Aminochrome toxicity is mediated by inhibition of microtubules polymerization through the formation of adducts with tubulin. *Neurotoxicity Research* 29 (3): 381-393.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. 2007. Respuestas de las plantas a las señales internas y externas. En: *Biología* 7a. ed. (pp. 788-817). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana
- Canel, C., Moraes, R.M., Dayan, F.E., Ferreira, D. 2000. Podophyllotoxin. *Phytochemistry* 54(2): 115-120.
- Caron, E. 2003. Rac signalling: a radical view. *Nature Cell Biology* 5 (3): 185-187.
- Carvalho, G., Quecine, M.C., Longatto, D.P., Peters, L.P., Almeida, J.R., Shyton, T. G., Silva, M.M.L., Crestana, G.S., Creste, S., Monteiro-Vitorello, C.B. 2016. *Sporisorium scitamineum* colonisation of sugarcane genotypes susceptible and resistant to smut revealed by GFP-tagged strains. *Annals Applied Biology* 169: 329-341.
- Carver, T.L.W., Zeyen, R.J., Buschnell, W.R., Robbins, M.P. 1994. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D. C.). *Physiology Molecular Plant Pathology* 44: 261-272.

- Case, L.B., Waterman, C.M. 2015. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology* 17 (8): 955-963.
- Castoldi, M., Popov, A.V. 2003. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expression and Purification* 32: 83-88.
- Casu, R.E., Dimmock, C.M., Chapman, S.C., Grof, C.P.L., McIntyre, C.L., Bonnett, G. D., Manners, J.M. 2004. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Molecular Biology* 54 (4): 503-517.
- Casu, R.E., Jarmey, J.M., Bonnett, G.D., Manners, J.M. 2007. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. *Functional and Integrative Genomics* 7 (2):153-167.
- Charnay, D., Nari, J., Noat, G. 1992. Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines-interactions with the effects of metal ions. *European Journal of Biochemistry* 205: 711-714.
- Chen, H., McCaig, B.C., Melotto, M., He, S.Y., Howe, G.A. 2004. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *Journal of Biological Chemistry* 279: 45998-46007.
- China A., Rodríguez E. 1994. *Sugarcane Disease*. Ciudad Habana, Cuba: Publicaciones Imago.
- Cho, J.Y., Choi, G.J., Son, S.W., Jang, K.S., Lim, H.K., Lee, S. O., Sung, N.D., Cho, K.Y., Kim, J.C. 2007. Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi. *Pest Management Science* 63: 935-940.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., Horwitz, A.R. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature Cell Biology* 10 (9): 1039-1050.
- Comstock J.C., Lentini R.S. 2005. Sugar smut disease. SS-AGR-208, Series of the Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Conway E.J. 1962. Microdiffusion analysis and volumetric error. 2a ed. Crosby Loockwood, London, UK.
- Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *Journal of Cell Biology* 105: 1473-1478.
- Cox, M., Hogarth, M., Smith, G. 2000. Cane breeding and improvement. En: H. Hogarth,

- P. Allsopp, (eds.). *Manual of cane growing*. (pp. 91-108). Bureau of Sugar Experimental Stations: Indooroopilly, Australia.
- Daniels, J., Roach, B.T. 1987. Taxonomy and evolution. En: D.J., Heinz (ed.). *Sugarcane improvement through breeding*, vol. 11 (pp. 7-84). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Davin, L.B., Lewis, N.G. 1992. Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. En: H.A. Stafford, R.K. Ibrahim, (eds.). *Phenolic Metabolism in Plants* (pp. 325-375). Nueva York, USA: Plenum Press
- Davin, L.B., Lewis, N.G. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* 123: 453-461.
- Davin, L.B., Wang, H.B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M., Sarkanen, S., Lewis, N.G. 1997. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active centre. *Science* 275: 362-366.
- Deacon, J. 2006. Fungal structure and ultrastructure. En *Fungal Biology* 4a. ed. (pp. 48-66). Malden, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Delley, P.A., Hall, M.N. 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *The Journal of Cell Biology* 147(1): 163-174.
- Díaz, E.M., Vicente-Manzanares, M., Legaz, M.E., Vicente, C. 2015. A cyanobacterial β -actin-like protein, responsible for lichenized *Nostoc* sp. motility towards a fungal lectin. *Acta Physiologiae Plantarum* 37 (11): 249.
- Díaz, E.M., Vicente-Manzanares, M., Sacristán, M., Vicente, C., Legaz, M.E., 2011. Fungal lectin of *Peltigera canina* induces chemotropism of compatible *Nostoc* cells by constriction-relaxation pulses of cyanobiont cytoskeleton. *Plant Signalling and Behavior* 6 (10): 1525-1536.
- Dixon, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411(6839): 843-847.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32: 479-501.
- Domínguez, F., Cejudo, F.J. 2015. Nuclear dismantling events: crucial steps during the execution of plant programmed cell death. En: A.N. Gunawardena, P.F. McCabe (eds.). *Plant Programmed Cell Death* (p. 163-189). Suiza: Springer International Publishing.
- Draper, J. 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. *Trends in Plant Sciences* 2 (5): 162-165.

- Duran, R. 1973. Ustilaginales. En: G.C Ainsworth, F.K. Sparrow, A.S. Sussman (eds.). *The Fungi*. Academic, vol. IVB (pp. 281-300). York, USA: Press, Nueva.
- Dutheil, J., Mannhaupt, G., Schweizer, G., Sieber, C.M.K., Münsterkötter, M., Gükdener, U., Schirawski, J., Kahmann, R. 2016. A tale of genome compartmentalization: the evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome Biology and Evolution* 8 (3): 681-704.
- Ebel, J., Cosio, E.G. 1994. Elicitors of plant defence responses. *International Review of Cytology* 148: 1-36.
- Eddy R.J., Pierini L.M., Matsumura F., Maxfield F.R. 2000. Ca^{2+} -dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *Journal of Cell Sciences* 113:1287-1298.
- Edwards, G.E., Huber, S.C. 1981. The C4 pathway. En M.D. Hatch, N.Y. Boardman (eds.). *The biochemistry of plants. Photosynthesis*, vol. 8 (pp. 237-281). Nueva York, USA: Academic Press.
- Egan, M.J., McClintock, M.A., Teck-Peterson, S.L. 2012. Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* 15: 637-645.
- Einhellig, F.A., Rasmussen, J.A. 1979. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 5 (5): 815-824.
- Escobar, M.A., Dandekar, A.M. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8(8): 380-386.
- Escribano, M. I., Legaz, M.E. 1988. High performance liquid chromatography of the dansyl derivatives of putrescine, spermidine, and spermine. *Plant physiology* 87 (2): 519-522.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 (6916): 629-635.
- Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., Yamada, K.M. 2007. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin microtubule crosstalk. *Nature Cell Biology* 9 (3): 299-309.
- Farage-Barhom, S., Burd, S., Sonogo, L., Mett, A., Belausov, E., Gidoni, D., Lers, A. 2011. Localization of the *Arabidopsis* senescence- and cell death-associated BFN1 nuclease: from the ER to fragmented Nuclei. *Molecular Plant* 4: 1062-1073.
- Ferreira, S. A., Comstock, J. C. 1989. Smut. En: C., Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillaspie, C.G., Hughes (eds.) *Diseases of Sugarcane* (pp. 211-229). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier,
- Fiorentini, C., Falzano, L., Travaglione, S., Fabbri, A. 2003. Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic

- bacteria. *Cell Death & Differentiation* 10 (2): 147-152.
- Fischer, R. 1999. Nuclear movement in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 39-68.
- Fischer, R., Zekert, N., Takeshita, N. 2008. Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology* 68: 813-826.
- Flors, V., Leyva, M.D.L.O., Vicedo, B., Finiti, I., Real, M.D., García-Agustín, P., Bennett, A.B., González-Bosch, C. 2007. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *The Plant Journal* 52 (6): 1027-1040.
- Fontaniella, B., Márquez, A., Rodríguez, C. W., Piñón, D., Solas, M.T., Vicente, C., Legaz, M.E. 2002. A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40 (10): 881-889.
- Fontaniella B., Millanes A.M., Vicente C., Legaz M.E. 2004. Concanavalin A binds to a mannose containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 773-779.
- Francl, L.J. 2001. The disease triangle: a plant pathological paradigm revisited. *Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-T-2001-0517-01.
- Franz, H., Ziska, P., Mohr, J. 1982. Lectins- definition and classification. *Acta histochemica* 71 (1):19-21.
- Frias, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C., Mercade, E. 2010. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria. *Microbial Ecology* 59: 476-486.
- Fuchs, U., Manns, I., Steinberg, G. 2005. Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell* 16: 2746-2758.
- Fuell, C., Elliott, K.A., Hanfrey, C.C, Franceschetti, M., Michael, A.J. 2010. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 513-520.
- Fuqua C., Parsek M.R., Greenberg E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics* 35: 439-468.
- Fuss, E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. *Phytochemistry Reviews* 2 (3): 307-320.
- Gabriel y Galán, J.M. 2002. *Biología Vegetal*. Madrid, España. Ediciones técnicas y científicas

- Galloway, W.R.J.D., James, T., Hodgkinson, J.T., Bowden, S., Welch, M., Spring, D.R. 2012. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* 20: 449–458.
- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., Díaz, J. 2015. Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology* 176: 202–209.
- Gerlitz, G., Bustin, M. 2010. Efficient cell migration requires global chromatin condensation. *Journal of Cell Sciences* 123 (3): 2207–2217.
- Gerlitz, G., Reiner, O., Bustin, M. 2013. Microtubule dynamics alter the interphasenucleus. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (7): 1255–1268.
- Gill, S.S, Tuteja, N. 2010. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling and Behavior* 5: 26–33.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205–227.
- Goldstein, J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. 1980. What should be called a lectin? *Nature* 285: 66.
- Gottlieb, M., Chavko, M. 1987. Silver staining of native and denatured eukaryotic DNA in agarose gels. *Analytical Biochemistry* 165, 33–37.
- Gould, J., Northcote, D.H. 1986. Cell-cell recognition of host surfaces by pathogens: the adsorption of maize (*Zea mays*) root mucilage by surfaces of pathogenic fungi. *Biochemical Journal* 233: 395–405.
- Grant N.J., Oriol-Audit C., Dickens M.J. 1983. Supramolecular forms of actin induced by polyamines; an electron microscopic study. *European Journal of Cell Biology* 30: 67–73.
- Grunwald, I., Heinig, I., Thole, H. H., Neumann, D., Kahmann, U., Kloppstech, K., Gau, A.E. 2007. Purification and characterisation of a jacalin-related, coleoptile specific lectin from *Hordeum vulgare*. *Planta* 226 (1): 225.
- Guan Y., Ramalingam S., Nagegowda D., Taylor P.W., Chye M.L. 2008. Brassica juncea chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates Gram-negative bacteria. *Journal of Experimental Botany* 59 (12): 3475–3484.
- Guevara-Olvera, L., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Herrera, J. 1997. Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of *Ustilago maydis*: evidence for a role of polyamines in its

- dimorphic transition. *Microbiology* 143 (7): 2237-2245.
- Gundersen, G.G., Bulinski, J.C. 1988. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (16): 5946-5950.
- Gupta, K., Dey, A., Gupta, B. 2013a. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2015-2036.
- Gupta, P., Ravi, I., Sharma, V. 2013b. Induction of β -1, 3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Journal of Plant Interactions* 8 (2): 155-161.
- Hano, C., Addi, M., Fliniaux, O., Bensaddek, L., Duverger, E., Mesnard, F., Lamblin, F., Lainé, E. 2008. Molecular characterization of cell death induced by a compatible interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *linii* and flax (*Linum usitatissimum*) cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (5): 590-600.
- Hazra, Chattopadhyay, S. 2016. An overview of lignans with special reference to podophyllotoxin, a cytotoxic lignan. *Chemical Biology Letters* 3 (1): 1-8
- Heinze, B.S., Thokoane, L.N., Williams, N.J., Barnes, J.M., Rutherford, R.S. 2001. The smut-sugarcane interaction as a model system for the integration of marker discovery and gene isolation. *South African Sugar Association Experiment Station* 75: 88-93.
- Hogan, D.A. 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell* 5 (4): 613-619.
- Hou W.C., Chen Y.C., Lin Y.H. 1998. Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 93-97.
- Hwang, B., Lee, J., Liu, Q.H., Woo, E.R., Lee, D.G. 2010. Antifungal effect of (+)-pinoresinol isolated from *Sambucus williamsii*. *Molecules* 15 (5): 3507-3516.
- Hwang, B., Cho, J., Hwang, I.S., Jin, H.G., Woo, E.R., Lee, D.G. 2011. Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications* 410 (3): 489-493.
- Imoto T., Yagishita K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry* 35: 1154-1156.
- Incharoensakdi, A., Jantaro, S., Raksajit, W., Mäenpää, P. 2010. Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress. En: A. Méndez-Vilas (ed.). *Current research, technology and education topics in applied microbiology*

- and microbial biotechnology (pp. 23-32). Badajoz, España: Formatex.
- Islam, M.T. 2008. Dynamic rearrangement of F-actin organization triggered by host specific plant signal is linked to morphogenesis of *Aphanomyces cochlioides* zoospores. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65: 553-562.
- Izadi M.B., Moosawi-Jorf S.A. 2007. Isolation and identification of yeast-like and mycelial colonies of *Sporisorium scitamineum* using specific primers. *Asian Journal of Plant Sciences* 6 (7):1137-1142.
- Jacobs, Ch.W., Adams, A.E.M., Szaniszlo, P.J., Pringle, J.R. 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology* 107:1409-1426.
- Jenkinson, C.P., Grody, W.W., Cederbaum, S.D. 1996. Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 114 (1): 107-132.
- Jevtić, P., Edens, L.J., Vukovic, L.D., Levy, D.L. 2014. Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance. *Current Opinion in Cell Biology* 28: 16-27.
- Jiang, J.F., Han, Y., Xing, L.J., Xu, Y.Y., Xu, Z.H., Chong, K. 2006. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. *Toxicon* 47 (1): 133-139.
- Joint, I., K. Tait, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Milton, P. Williams, and M. Camara 2002. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science* 298 (5596):1207.
- Jongedijk, E., Tigelaar, H., Van Roekel, J.S., Bres-Vloemans, S.A., Dekker, I., van den Elzen, P.J., Melchers, L.S. 1995. Synergistic activity of chitinases and β -1, 3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. En: A.C. Cassells, P.W. Jones (eds.). *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making* (pp. 173-180). Países Bajos: Springer Netherlands.
- Joos, U., van Aken, J., Kristen, U. 1994. Microtubules are involved in maintaining the cellular polarity in pollen tubes of *Nicotiana sylvestris*. *Protoplasma* 179 (1-2): 5-15.
- Julien, M.H.R., Irvine, J. E., Benda, G.T.A. 1988. Sugarcane anatomy, morphology and physiology. En: C. Ricaud, B.T. Began, A.G. Gillaspie, C.G. Hughes (eds.). *Diseases of Sugarcane-Major Diseases* (pp.1-19). Ámsterdam, Países Bajos: Elsevier Science Publishers B. V.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M., Kämper, J. 2000. *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. En: J.W. Kronstad (ed.). *Fungal Pathology* (pp. 347-371).

- Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publishers.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. 2003. RNA Silencing in the Phytopathogenic Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (9): 769-776.
- Khatri, M., Rajam, M.V. 2007. Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Medical Mycology* 45: 211-220.
- Katsumi, A., Milanini, J., Kiosses, W.B., del Pozo, M.A., Kaunas, R., Chien, S., Hahn, K.M., Schwartz, M.A. 2002. Effects of cell tension on the small GTPase rac. *Journal of Cell Biology* 158 (1): 153-164.
- Kaupp U.B., Kashikar N.D., Weyand I. 2008. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual Review of Physiology* 70: 93-117.
- Kazami, S., Usui, T., Osada, H. 2011. Actin stress fiber retraction and aggresome formation is a common cellular response to actin toxins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 75: 1853-1855.
- Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnár, Z., Piñon, M.C., Dear, N., Valdar, W. 2007. Mutations in α -tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* 128 (1): 45-57.
- Keen, N.T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24 (1): 447-463.
- King, M.C., Drivas, T.G., Blobel, G. 2008. A network of nuclear envelope membrane proteins linking centromeres to microtubules. *Cell* 134 (3): 427-438.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 97 (16): 8849-8855.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., Sellers, J.R. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *Journal of Biological Chemistry* 279: 35557-35563.
- Kuc, J. 1990. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. En: D.J. Chadwick, J. Marsh (eds.). *Ciba Foundation Symposium 154- Bioactive Compounds from Plants* (pp. 213-224). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kulik, T., Buśko, M., Puszczkowska, A., Perkowski, J., Okorski, A. 2014. Plant lignans inhibit growth and trichothecene biosynthesis in *Fusarium*

- graminearum. *Letters in applied microbiology* 59 (1): 99-107.
- Kurihara, L.J., Beh, C.T., Latterich, M., Schekman, R., Rose, M.D. 1994. Nuclear congression and membrane fusion: two distinct events in the yeast karyogamy pathway. *The Journal of Cell Biology* 126 (4): 911-923.
- Kwaga, J.K.P., Umoh, J.U., Odoba, M.B. 1988. *Cryptosporidium* infections in humans with gastroenteritis in Zaria, Nigeria. *Epidemiology and infection* 101 (1): 93-97.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Langner, T., Göhre, V. 2016. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics* 62 (2): 243-254.
- Lannoo, N., Van Damme, E.J. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in Plant Sciences* 5: 397.
- LaO, M., Arencibia, A. D., Carmona, E. R., Acevedo, R., Rodríguez, E., León, O., Santana, I. 2008. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports* 27 (6): 1103-1111.
- Ledon, A.C. F.A.Z. Gonzales 1950. Industrialization of photosynthesis through the use of sugar cane. *Proceedings Cuban Sugar Technologist* 24: 563-572.
- Lee, C.S., Choi, C.K., Shin, E.Y., Schwartz, M.A., Kim, E.G. 2010. Myosin II directly binds and inhibits dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to rho family GTPases. *Journal of Cell Biology* 190 (4): 663-674.
- Lee, W., Oberle, J.R., Cooper, J.A. 2003. The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. *Journal of Cell Biology* 160 (3): 355-364.
- Legaz, M.E., de Armas, R., Millanes, A.M., Rodríguez, C.W., Vicente, C. 2005. Heterofructans and heterofructan-containing glycoproteins from sugarcane: structure and function. *Recent Research Developments in Biochemistry* 6: 31-51.
- Legaz, M.E., de Armas R., Piñón, D., Vicente, C., 1998a. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *Journal of Experimental Botany* 49: 1723-1728.
- Legaz M.E., Fontaniella B., Millanes A.M., Vicente C. 2004. Secreted arginases from phylogenetically far-related lichens species act as cross-

- recognition factors for two different algal cells. *European Journal of Cell Biology* 83: 435-446.
- Legaz, M.E., Martin, L., Pedrosa, M.M, Vicente, C., de Armas, R., Martínez, M., Medina, I., Rodríguez, C.W. 1990. *Plant Physiology* 92 (3): 679-683.
- Legaz, M.E., Millanes, A.M., Fontaniella, B., Piñon, D., de Armas, R., Rodríguez, C.W., Solas, M.T., Vicente C. 2006. Ultrastructural alterations of sugarcane leaves caused by common sugarcane pathogens. *Belgian Journal of Botany* 139: 79-91.
- Legaz, M.E., Pedrosa, M.M., de Armas, R., Rodríguez, C.W., de los Ríos, V., Vicente, C. 1998b. Separation of soluble glycoproteins from sugarcane juice by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 372: 201-208.
- Legaz, M.E., Pedrosa, M.M., Martínez, M., Vicente, C. 1995. Soluble glycoproteins from sugarcane juice analyzed by SE-HPLC and fluorescence emission. *Journal of Chromatography* 697: 329-335.
- Legaz M.E., Santiago R., de Armas R., Alarcón B., Díaz E.M., Sánchez-Elordi E., Sacristán M., Fontaniella B., Millanes A.M., Blanch M., Vicente C. 2011. Molecular defence responses of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) to smut (*Sporisorium scitamineum* (Syd.) Piepenbr & Oberw. 2002). En: Méndez-Vilas A. (ed.). *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* (pp. 1244-1250). Badajoz, España: Formatex.
- Legaz, M.E., Vicente, C. 1982. Two forms of arginase in *Evernia prunastri*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 104: 1441-1446.
- Legaz, M.E., Vicente, C., de Armas, R. 1998c. Polyamines and phenols in commercial sugar preparations. *International Sugar Journal* 100: 433-436.
- Legaz, M.E., Vicente, C., Pedrosa, M.M. 2001. Binding of lichen phenolics to purified secreted arginase from the lichen *Evernia prunastri*. *BMB Reports* 34 (3): 194-200.
- Lewis, N.G., Davin, L.B. 1999. Lignans: biosynthesis and function. En: D.H.R. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn (eds.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 1 (pp 639-712). London, UK: Elsevier.
- Lewis, N.G., Davin, L.B., Sarkanen, S. 1999. The nature and function of lignins. En: D.H.R. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn (eds.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 1 (pp 618-745). London, UK: Elsevier.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E. 1990. Lignin: occurrence, biosynthesis and biodegradation. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 41(1):455-496.

- Li, L., Cheng, X.F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S. A., Chiang, V.L. 2001. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 13:1567-1585.
- Lloyd H.L., Naidoo G. 1983. Chemical array potentially suitable for determination of smut resistance of sugarcane cultivars. *Plant Disease* 67, 1103-1105.
- Lloyd, H.L., Pillay, M. 1980. The development of an improved method for evaluating sugarcane for resistance to smut. *Proceedings of South African Sugar Technologists* 54:168-172.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Loudon, R.P., Silver, L.D., Yee, H.F., Gallo, G. 2006. RhoA-kinase and myosin II are required for the maintenance of growth cone polarity and guidance by nerve growth factor. *Journal of Neurobiology* 66 (8): 847-867.
- De Lozanne, A., Spudich, J. 1987. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236: 1086-1140.
- Lu, W., Schneider, M., Neumann, S., Jaeger, V.M., Taranum, S., Munck, M., Cartwright, S., Richardson, C., Carthew, J., Noh, K., Goldberg, M., Noegel, A.A., Karakesisoglou, I. 2012. Nesprin interchain associations control nuclear size. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (20): 3493-3509.
- Luthra, J.C., Suttar, A, Sandhu, S.S. 1940. Experiments on the control of smut of sugarcane (*Ustilago scitaminea* Syd.). *Proceedings in Indian Academy of Sciences, Sec. B.* 12 (4): 118-128.
- Lyimo, B., Funakuma, N., Minami, Y., Yagi, F. 2012. Characterization of a new agalactosyl-binding lectin from the mushroom *Clavaria purpurea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76 (2), 336-342.
- Ma, Q.H., Zhen, W.B., Liu, Y.C. 2013. Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. *Biochimie* 95 (2): 359-365.
- McCormick, A.J., Cramer, M.D., Watt, D.A. 2008. Differential expression of genes in the leaves of sugarcane in response to sugar accumulation. *Tropical Plant Biology* 1 (2): 142-158.
- MacRae, W.D., Towers, G.N. 1984. Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23 (6): 1207-1220.

- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., Willats, W.G.T. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Sciences* 5: 178.
- Martínez, M., Medina, I., Naranjo, S., Rodríguez, C.W., de Armas, R., Piñón, D., Vicente, C., Legaz, M.E. 2000. Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). *International Sugar Journal*: 102: 445-448.
- Martínez-Espinoza, A.D., García-Pedrajas, M. D., Gold, S.E. 2002. The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology* 35 (1): 1-20.
- Marx, F., Binder, U., Leiter, E., Pócsi, I. 2008. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cellular and Molecular of Life Sciences* 65 (3): 445-454.
- Matsushita, Y., Ko, C., Aoki, D., Hashigaya, S., Yagami, S., Fukushima, K. 2015. Enzymatic dehydrogenative polymerization of monolignol dimers. *Journal of Wood Science* 61 (6): 608-619.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1, 3-glucanase. *Plant physiology* 88 (3): 936-942.
- Mauch-Mani, B., Slusanrenko, A.J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*: 8: 203-212.
- Mechulam, A., Chernov, K.G., Mucher, E., Hamon, L., Curmi, P.A., Pastré, D. 2009. Polyamine sharing between tubulin dimers favours microtubule nucleation and elongation via facilitated diffusion. *PLoS Computational Biology* 5: e1000255.
- Mettraux, J.P., Boller, T.H. 1986. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28 (2): 161-169.
- Millanes, A.M., Fontaniella, B., Legaz, M.E., Vicente, C. 2005. Glycoproteins from sugarcane plants regulate cell polarity of *Ustilago scitaminea* teliospores. *Journal of Plant Physiology* 162: 253-265.
- Millanes, A.M., Vicente, C., Legaz, M.E., 2008. Sugarcane glycoproteins bind to surface, specific ligands and modify cytoskeleton arrangement of *Ustilago scitaminea* teliospores. *Journal of Plant Interactions* 3: 95-110.

- Milloning, G. 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *Journal of Applied Physics* 32:1637-1650.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Pittman, R. N. (1999). Extranuclear apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 146(4): 703-708.
- Mogessie, B., Schuh, M. 2014. Nuclear envelope breakdown: actin quick to tear down the wall. *Current Biology* 24 (13): 605-607.
- Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., Palme, K. 2001. *Arabidopsis thaliana* Rho GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO Journal* 20: 2779-2788.
- Molina, M.C., Stocker-Wörgötter, E., Turk, R., Bajon, C., Vicente, C. 1998. Secreted, glycosylated arginase from *Xanthoria parietina* thallus induces loss of cytoplasmic material from *Xanthoria* photobionts. *Cell Communication & Adhesion* 6(6): 481-490.
- Molina M.C., Vicente C. 1995. Correlations between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina* phycobionts. *Cell Adhesion and Communication* 3: 1-12.
- Mollinedo, F., Gajate, C. 2003. Microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8: 413-450.
- Moon, S. S., Rahman, A. A., Kim, J. Y., Kee, S. H. 2008. Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16(15):7264-7269.
- Moore, P.H. 1987. Anatomy and morphology. En: D.J. Heinz (ed.). *Sugarcane improvement through breeding* (pp. 273-311). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Morris, N.R. 2000. Nuclear migration from fungi to the mammalian brain. *Journal of Cell Biology* 148: 1097-1101.
- Moss, G.P. 2000. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and applied chemistry* 72 (8): 1493-1523.
- Mörschbacher, B., Noll, U., Gorrichon, L., Reisener, H. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to wheat stem rust. *Plant Physiology* 93: 465-470.
- Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Shigenori Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y., Hasebe, M. 2013. Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Communications* 4: 1967.
- Naismith, J.H., Field, R.A. 1996. Structural basis of trimannoside recognition by

- concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* 271(2): 972-976.
- Nakatsubo, T., Mizutani, M., Suzuki, S., Hattori, T., Umezawa, T. 2008. Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis. *Journal of biological chemistry* 283 (23): 15550-15557.
- Nevalainen, H., Penttilä, M. 1995. Molecular biology of cellulolytic fungi. En: U. Kück (ed.). *Genetics and biotechnology* (pp. 303-319). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Oliveira, C., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2014. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application—the frutalin case study. *Frontiers in Plant Science* 5: 390.
- Onnerud H., Zhang L., Gellerstedt G., Henriksson G. 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *The Plant Cell* 14: 1953–1962.
- Page, B., Snyder, M. 1993. Chromosome segregation in yeast. *Annual Review of Microbiology* 47, 201–231.
- Peterson, D.A., Peterson, D.C., Reeve, H.L., Archer, S.L., Weir, E.K. 1999. GTP (γ S) and GDP (β S) as electron donors: new wine in old bottles. *Life Sciences* 65 (11): 1135–1140.
- Pillai, M.C., Baldwin, J.D. Cherr, G.N. 1992. Early development in an algal gametophyte: role of the cytoskeleton in germination and nuclear translocation. *Protoplasma* 170 (1): 34-45.
- Pinto, L.S., Nagano, C.S., Oliveira, T.M., Moura, T.R., Sampaio, A.H., Debray, H., Pinto, V.P., Dellagostin, O.A., Cavada, B.S. 2008. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *Journal of Biosciences* 33 (3): 355–363.
- Pinzón, A., Barreto, E., Bernal, A., Luke, A., Barrios, A. F., Isea, R., Restepo, S. 2009. Computational models in plant-pathogen interactions: The case of *Phytophthora infestans*. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 6 (1): 24-35.
- Piñón, D., de Armas, R., Vicente, C., Legaz, M.E. 1999. Role of polyamines in the infection of sugarcane buds by *Ustilago scitaminea* spores. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 57–64.
- Pohjanpelto, P., Virtanen, I., Hölttä, E. 1981. Polyamine starvation causes disappearance of actin filaments and microtubules in polyamine-auxotrophic CHO cells. *Nature* 293: 475- 477.
- Pollard, T. D., Cooper, J. A. 2009. Actin, a central player in cell shape and

- movement. *Science* 326 (5957): 1208-1212.
- Potty, V.H. 1969 Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. *Analytical Biochemistry* 29: 535-539
- Que, Y., Su, Y., Guo, J., Wu, Q., Xu, L. 2014a. A global view of transcriptome dynamics during *Sporisorium scitamineum* challenge in sugarcane by RNA-Seq. *PloS ONE*, 9 (8): e106476.
- Que, Y., Xu, L., Lin, J., Ruan, M., Zhang, M., ChenKey, R. 2011. Differential protein expression in Sugarcane during Sugarcane-*Sporisorium scitamineum* interaction revealed by 2-DE and MALDI-TOF-TOF/MS. *Comparative and Functional Genomics*: 989016.
- Que, Y., Xu, L., Wu, Q., Liu, Y., Ling, H., Liu, Y., Zhang, Y., Guo, J., Su, Y., Chen, J., Wang, S., Zhang, C. 2014b. Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut. *Genomics* 15: 996-1014.
- Raftopoulou, M., Hall, A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology* 265 (1): 23-32.
- Rajam, M.V., Galston, A.W. 1985. The effects of some polyamine biosynthetic inhibitors on growth and morphology of phytopathogenic fungi. *Plant Cell Physiology* 26: 683-692.
- Rajam, M.V., Weinstein, L.H., Galston, A.W. 1985. Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 6874-6878.
- Rajendran, S., Lin, I.W., Chen, M.J., Chen, C. Y., Yeh, K. 2014. Differential activation of sporamin expression in response to abiotic mechanical wounding and biotic herbivore attack in the sweet potato. *BMC Plant Biology* 14 (1):112.
- Rando, O.J., Zhao, K., Crabtree, G.R. 2000. Searching for a function for nuclear actin. *Trends in Cell Biology* 10: 92-97.
- Rashid, M.H., Rajanna, C., Ali, A., Karaolis, D.K. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters* 227 (1):113-119.
- Rejeb, I. B., Pastor, V., and Mauch-Mani, B. 2014. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants* 3 (4): 458-475.
- Requena, M.E., Egea-Gilabert, C., Candela, M. E. 2005. Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum* 124 (1): 50-60.

- Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-12.
- Ridley, A. J., Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review in Phytopathology* 49: 317-343.
- Rodríguez, O.A., González, V.R. 1984. Caracterización de variedades de caña de azúcar. *Caña de azúcar* 2: 89-108.
- Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M. Waterman-Storer, C.M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology* 5 (7): 599-609.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., Cramer, L.P. 2001. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin-and myosin-dependent mechanism. *Current Biology* 11(23): 1847-1857.
- Ruiz-Herrera J., Leon C.G., Guevara-Olivera L., Carabez-Trejo A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* 141: 695-703.
- Russell, L.D., Russell, J.A., MacGregor, G.R., Meistrich, M.L. 1991. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *American Journal of Anatomy* 192 (2): 97-120.
- Saavedra Hernández E., Pérez-Santiago A., Pérez-Campos E., Córdoba-Alva F. 2003. Efecto de la Concanavalina A en el cultivo del fitopatógeno *Ustilago maydis*. *Interciencia* 28 (5): 276-280.
- Santiago, R., Alarcón, B., de Armas, R., Vicente, C., Legaz, M.E. 2012. Changes in the cinnamyl alcohol dehydrogenase activities from sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. *Physiologia Plantarum* 145: 245-259.
- Santiago, R., de Armas, R., Fontaniella, B., Vicente, C., Legaz, M.E. 2009. Changes in soluble and cell wall-bound hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. *European Journal of Plant Pathology* 124 (3): 439-450.
- Santiago R., Fontaniella, B., Millanes, Vicente C., Legaz M.E. 2008. Biochemical responses of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). En: M.E. Legaz, C.

- Vicente (eds.). *Biochemical Responses of Plants to Invaders* (pp.125-138). Trivandrum, Kerala, India: Research Singpost.
- Santiago R., Millanes A.M., Legaz M.E., Vicente C. 2012b. Measurement of β -1,3 glucanase activity in permeabilized discs of leaves of healthy and scald-diseased plants. *Journal of Life Sciences* 6: 175-181.
- Salinas, R.E., Ogohara, C., Thomas, M.I., Shukla, K.P., Miller, S.I., Ko, D.C. 2014. Acellular genome-wide association study reveals human variation in microtubule stability and a role in inflammatory cell death. *Molecular Biology of the Cell* 25: 76-86.
- Savarin, P., Barbet, A., Delga, S., Joshi, V., Hamon, L., Lefevre, J., Nakib, S., de Bandt, J.P., Moinard, C., Curmi, P.A., Pastré, D. 2010. A central role for polyamines in microtubule assembly in cells. *Biochemical Journal* 430: 151-159.
- Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B. 1979. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277 (5698): 665-667.
- Schwarzerová, K., Vondráková, Z., Fischer, L., Boríková, P., Bellinvia, E., Eliášová, K., Havelková, L., Fiserová, J., Vágner, M., Opatrný, Z. 2010. The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biology* 10 (1): 89-97.
- Selman-Housein, G., López, M. A., Hernández, D., Civardi, L., Miranda, F., Riga, J., Puigdomènech, P. 1999. Molecular cloning of cDNA coding for three sugarcane enzymes involving in lignification. *Plant Science* 143: 163-171.
- Simmons, C.R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1, 3- β -D-glucanases and 1,3; 1,4- β -D-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (4), 325-387.
- Singh N., Somai B.M., Pillay D. 2004. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivar. *Plant Science* 167:987-994.
- Sjogblad, R.D., Chet, I., Mitchell, R. 1978. Quantitative assay for algal chemotaxis. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 847-850.
- Smith, A.M., Stitt, M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* 30 (9): 1126-1149.
- Snetselaar, K.M., Mims, C.W. 1992. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* 84: 193-203.
- Snyder, M., Gehrung, S., Page, B.D. 1991. Studies concerning the temporal and genetic control of cell polarity in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 11: 515-532.

- Sourjik V., Wingreen N.S. 2012. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology* 24: 262-268.
- Steinberg, G. 2007. Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytologist* 174: 721-733.
- Steinberg, G., Wedlich-söldner, R., Brill, M., Schulz, I. 2001. Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *Journal of Cell Science* 114: 609-622.
- Sterjiades R., Dean J.F.D., Eriksson K.E.L. 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology* 99: 1162-1168.
- Sterjiades R., Dean J.F.D., Gamble G., Himmelsbach D.S., Eriksson K.E.L. 1993. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. *Planta* 190: 75-87.
- Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J., Hyman, A.A. 2011. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 469: 226-230.
- Stites J., Wessels D., Uhl A., Egelhoff T., Shutt D., Soll D.R. 1998. Phosphorylation of the *Dictyostelium* myosin II heavy chain is necessary for maintaining cellular polarity and suppressing turning during chemotaxis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39 (1): 31-51.
- Strange, P.G. 2010. Use of the GTPγS ([³⁵S]GTPγS and Eu-GTPγS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* 161 (6): 1238-1249.
- Straube, A., Weber, I., Steinberg, G. 2005. A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *EMBO Journal* 24 (9):1674-1685.
- Su, Y.C., Xu, L.P., Xue, B.T., Wu, Q.B. Guo, J. L., Wu, L.G., Que, Y.X. 2013. Molecular cloning and characterization of two pathogenesis-related β-1, 3-glucanase genes ScGluA1 and ScGluD1 from sugarcane infected by *Sporisorium scitamineum*. *Plant cell reports* 32 (10): 1503-1519.
- Subirós, F. 1995. Origen e historia de la caña de azúcar. En: *El cultivo de la caña de azúcar* (pp. 3-8). Costa Rica: EUNED.
- Sumner J.B. 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry* 47: 5-9.
- Sundar, A.R. Ashwin, N.M.R., Barnabas, E.L., Malathi, P., Viswanathan, R. 2015. Disease resistance in sugarcane-an overview. *Scientia Agraria Paranaensis* 4: 200-2012.

- Sundar, A.R., Barnabas, E.L., Malathi, P., Viswanathan R. 2012. A mini-review on smut disease of sugarcane caused by *Sporisorium scitamineum*. En: J. Mworira (ed.). *Botany* (pp. 3-8). Croatia: InTech.
- Sydow, H. 1924. Notizen Über Ushlagineen. *Annales Micologici* 22: 277-291.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. 1998. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (1): 60-65.
- Taleisnik, S. 2006. Sistemas activados por vía de la familia Rho. En: *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de la Biología Celular* (pp. 127-136). Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor.
- Thaler, J.S., Karban, R., Ullman, D.E., Boege, K., Bostock, R.M. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* 131 (2): 227-235.
- Taniguti, L.M., Schaker, P.D., Benevenuto, J., Peters, L.P., Carvalho, G., Palhares, A., Quecine, M.C., Nunes, F.R.S., Kmit, M.C.P., Wai, A., Hausner, G., Aitken, K. S., Berkman, P.J., Fraser, J. A., Moolhuijzen, P.M., Coutinho, L.L., Creste, S., Vieira, M.L.C., Kitajima, J.P., Monteiro-Vitorello, C.B. 2015. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane. *PloS ONE* 10 (6): 1-31.
- Tashackori, H., Sharifi, M., Chashmi, N. A., Safaie, N., Behmanesh, M. 2016. Induced-differential changes on lignan and phenolic acid compounds in *Linum album* hairy roots by fungal extract of *Piriformospora indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127 (1): 187-194.
- Taxis, C., Maeder, C., Reber, S., Rathfelder, N., Miura, K., Greger, K., Stelzer, E.H., Knop, M. 2006. Dynamic organization of the actin cytoskeleton during meiosis and spore formation in budding yeast. *Traffic* 7 (12): 1628-1642.
- Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcão, E.P.S., Pereira, E.C. 2012. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84: 125-132.
- Tokeshi H. 2005. Doenças de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). En: H. Kimati, L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin Filho, L.E.A. Camargo (eds.). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas* 4. ed. (pp. 207-225). San Paulo, Brasil: San Paulo SP. Agronômica Ceres.

- ToliT-Nørrelykke, I.M. 2008. Push-me-pull-you: how microtubules organize the cell interior. *European Biophysics Journal* 37 (7): 1271–1278.
- Torrallba, S., Marjatta, R., Pedregosa, A.M., Laborda, F. 1998. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 144: 45-53.
- Torres, M.A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138 (4): 414–429.
- Trabucco, G.M., Matos, D.A., Lee, S.J., Saathoff, A.J., Priest, H.D., Mockler, T.C., Sarath, G., Hazen, S.P. 2013. Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid o-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnology* 13: 61-79.
- Tran, P.T., Marsh, L., Doye, V., Inoué, S., Chang, F. 2001. A Mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *Journal of Cell Biology* 153 (2): 397–412.
- Trione E.J. 1980. Teliospore formation by *Ustilago scitaminea* in sugarcane. *Phytopathology* 70: 513–516.
- Trione E.J. 1990. Growth and sporulation of *Ustilago scitaminea*, in vivo and in vitro. *Mycological Research* 94: 489–493.
- Tukey, J.W. 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5: 99–114.
- Umezawa, T. 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2 (3): 371-390.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153 (3): 895-905.
- Van Leeuwen, F.N., Van Delft, S., Kain, H.E., Van Der Kammen, R.A., Collard, J.G. 1999. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nature Cell Biology* 1(4): 242-248.
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A. 1999. The families of patogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 (2): 85-97.
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A., Ruiz-Herrera, J. 2009. *Ustilago maydis* spermidine synthase is encoded by a chimeric gene, required for morphogenesis, and indispensable for survival in the host. *FEMS Yeast Research* 9 (6) 923-935.
- Valdés-Santiago L., Guzmán de Peña D., Ruiz-Herrera J. 2010. Life without putrescine: disruption of the gene-encoding polyamine oxidase in *Ustilago*

- maydis odc mutants. FEMS Yeast Research* 10: 928-40
- Vargas-Arispuro, I., Contreras-Valenzuela, A., Martínez-Téllez, M.Á. 2009. Lignans from *Larrea tridentate* (creosote bush) as fungal β -1, 3-glucanase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94 (2), 60-63.
- Vargas-Arispuro, I., Reyes-Báez, R., Rivera-Castañeda, G., Martínez-Téllez, M. A., Rivero-Espejel, I. 2005. Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products* 22 (2): 101-107.
- Vicente-Manzanares, M., Koach, M.A., Whitmore, L., Lamers, M.L., Horwitz, A.F. 2008. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *Journal of Cell Biology* 183 (3): 543-554.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, A.R. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (11): 778-790.
- Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F. 2000. Cell polarization: A comparative cell biology and immunological view. *Developmental & Comparative Immunology* 7: 51-65.
- Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Reviews Immunology* 4 (2): 110-122.
- Vigers, A.J., Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4 (4): 315-323.
- Vogt, V., Cifuentes, D., Tonn, C., Sabini, L., Rosas, S. 2013. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. *Industrial Crops and Products* 42: 583-586.
- Vorotnikov, A.V. 2011. Chemotaxis: movement, direction, control. *Biochemistry (Moscow)* 76: 1528-1555.
- Waller, J.M. 1970. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. II Infection and resistance. *Transactions of the British Mycological Society* 54: 405-414.
- Walters, R.R. 1985. Ligands for mobilization. En: P.G.P. Dean, W.S. Johnson, F.A. Middle (eds.). *Affinity Chromatography, a Practical Approach* (pp. 114-166). Oxford, UK: IRL Press.
- Walters, D.R. 1995. Inhibition of polyamine biosynthesis in fungi. *Mycological Research* 199: 129-139.
- Wanderley-Nogueira, A.C.M., Kido, E.A., Soares-Cavalcanti, N.M., Belarmino, L.C., Bezerra-Neto, J.P., Burnquist, W., Chabregas, S.M., Baldani, J.I., Benko-Iseppon, A.M. 2012. Insight of

- pathogen defense mechanisms in the sugarcane transcriptome. *Functional Plant Science and Biotechnology* 6:134-148.
- Wang, H. H., Tanaka, H., Qin, X., Zhao, T., Ye, L. H., Okagaki, T., Katayama, T., Nakamura, A., Ishikawa, R., Thatcher, S.E., Wright, G.L., Kohama, K. 2008. Blebbistatin inhibits the chemotaxis of vascular smooth muscle cells by disrupting the myosin II-actin interaction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294 (5): 2060-2068.
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R., Hawkins, S. 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science* 4: 220-234.
- Wang Y., Chen C.L., Iijima M. 2011. Signaling mechanisms for chemotaxis. *Development, growth & differentiation* 53: 495-502.
- Wang, Q. M., Theelen, B., Groenewald, M., Bai, F. Y., Boekhout, T. 2014. *Moniliellomycetes* and *Malasseziomycetes*, two new classes in *Ustilaginomycotina*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 33 (1): 41-47.
- Waterman-Storer, C.M., Salmon, E.D. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Current opinion in cell biology* 11(1): 61-67.
- Webster, J. 1989. *Ustilaginomycetes: smut fungi and their allies*. En: J. Webster, R.W.S. Weber (eds.). *Introduction to Fungi*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Wendland, J., Philippsen, P. 2000. Determination of cell polarity in germinated spores and hyphal tips of the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii* requires a rhoGAP homolog. *Journal of Cell Sciences* 113 (9): 1611-1621.
- West, H.M., Walters, D.R. 1989. Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on growth of *Pyrenophora teres*, *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium culmorum* and *Septoria nodorum* in vitro. *Mycological Research* 92: 453-457.
- Williamson, D.H., Fennell, D.J. 1974. Apparent dispersive replication of yeast mitochondrial DNA as revealed by density labelling experiments. *Molecular and General Genetics MGG* 131 (3): 193-207.
- Windayani, N., Rukayadi, Y., Hakim, E.H., Ruslan, K., Syah, Y.M. 2014. Antifungal activity of lignans isolated from *Phyllanthus myrtifolius* Moon. against *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* 12: 33-39.
- Wilson, L., Jordan, M.A. 1995. Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chemistry and Biology* 2: 569-573.

- Wojtasik W., Kulma A., Namysł K., Preisner M., Szopa J. 2015. Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science* 6: 291.
- Xiang, X., Beckwith, S.M., Morris, N.R. 1994. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9: 2100-2104.
- Xiang, X., Plamann, M. 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* 6 (6): 628-633.
- Yajima, A 2014. Recent progress in the chemistry and chemical biology of microbial signaling molecules: quorum-sensing pheromones and microbial hormones. *Tetrahedron Letters* 55: 2773-2780.
- Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M., Ohashi, Y. 1998. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 118 (4): 1213-1222.
- Yang, Y.L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 36 (4): 223-228.
- Yang, Z. 2008. Cell polarity signaling in *Arabidopsis*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 551-575.
- Yao J., Allen C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 188 (10): 3697-3708.
- Yoder, S.C., Lancaster, S.M., Hullar, M.A. J., Lampe, J.W. 2014. Gut microbial metabolism of plant lignans: influence on human health. En: D. del Río, K. Tuohy (eds.). *Diet-microbe interactions in the gut: Effects on human health and disease* (pp. 103-117). Oxford, UK: Elsevier.
- Zarb, I., Walters. D.R. 1994. The effects of polyamine biosynthesis inhibitors on growth, enzyme activities and polyamine concentrations in the mycorrhizal fungus *Laccaria proxima*. *New Phytologist* 126: 99-104.
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Meng, D., Sheng, J. 2011. Methyl salicylate-induced arginine catabolism is associated with up-regulation of polyamine and nitric oxide levels and improves chilling tolerance in cherry tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (17): 9351-9357.
- Zhong, R., Morrison, W.H., Negrel, J., Ye, Z. H. 1998. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *The Plant Cell* 10 (12): 2033-2045.

Zieve, G.W., Turnbull, D., Mullins, J.M.,
McIntosh, J.R. 1980. Production of
large numbers of mitotic mammalian
cells by use of the reversible
microtubule inhibitor Nocodazole:
nocodazole accumulated mitotic cells.
Experimental Cell Research 126: 397-
405.